



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 750 043 A1**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:
27.12.1996 Bulletin 1996/52

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/52**, C12N 15/74,
C12N 9/00, C12N 1/21,
C12P 19/14, C12Q 1/68

(21) Numéro de dépôt: 95203663.0

(22) Date de dépôt: 28.12.1995

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT
SE

(30) Priorité: 20.06.1995 EP 95201669

(71) Demandeur: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
S.A.
1800 Vevey (CH)

(72) Inventeurs:
• Stingeles, Francesca
CH-1018 Lausanne (CH)
• Mollet, Beat
CH-1074 Mollie-Margot (CH)

(54) **Bactéries lactiques produisant des exopolysaccharides**

(57) Fragment d'ADN d'origine génomique codant pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un EPS, et capable suite à la transformation d'une bactérie lactique de restaurer la production d'un EPS dans ladite bactérie n'en produisant pas initialement, ou de modifier la structure de l'EPS produit initialement par ladite bactérie. Protéines de la souche *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1590 codées par le chromosome et qui sont impliquées dans la biosynthèse de l'EPS ayant la composition Glc:Gal:Gal-Nac=1:2:1. Procédé de fabrication d'un nouvel EPS, dans lequel on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant partiellement ou totalement pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un EPS, on transforme des bactéries lactiques produisant un autre EPS par le vecteur recombinant, puis on sélectionne une bactérie lactique produisant un nouvel EPS.

EP 0 750 043 A1

Description

La présente invention se rapporte à l'utilisation de fragments d'ADN chromosomique de bactéries lactiques codant pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'exopolysaccharides, ainsi que des enzymes codées par ces fragments.

Etat de la technique

Il est connu que les bactéries lactiques sont susceptibles de produire dans leur milieu de culture deux classes de polysaccharides, à savoir les homopolysaccharides comme les dextranes ou les levanes qui sont constitués par l'assemblage répété d'un seul sucre, et les hétéropolysaccharides appelés communément exopolysaccharides ou EPS (EPS est l'abréviation du terme "exopolysaccharide") constitués par l'assemblage de plusieurs sucres différents formant une unité répétitive (Cerning J., Bactéries lactiques, Vol I, de Rossart H et Luquet F. M., Loriga, 309-329, 1994).

Une bactérie lactique produisant un EPS peut conférer un caractère filant et/ou une texture lisse et crémeuse à un lait acidifié (Cerning *et al.*, FEMS Microbiol., 87, 113-130, 1990). Les EPS peuvent aussi présenter des activités biologiques particulièrement intéressantes pour la santé humaine ou animale, comme des activités anti-tumeurs ou probiotiques, par exemple (Oda M. *et al.*, Agric. Biol. Chem., 47, 1623-1625, 1983; EP94870139.6)

Par ailleurs, l'industrie est confrontée à une instabilité génétique de la biosynthèse des EPS dans les bactéries lactiques. Ceci se traduit généralement au cours d'une fermentation par la perte de la production d'EPS par tout ou partie des bactéries lactiques (voir "Cerning J." ci-dessus). Les produits fermentés industriels sont ainsi sujets à des variations dans leur contenu en EPS, ce qui n'est pas toujours acceptable. Pour remédier à ces problèmes, l'industrie recourt actuellement à l'isolation et la caractérisation périodique de ses bactéries de manière à séparer celles qui ont perdu leur caractère original.

La biosynthèse d'EPS dans les bactéries lactiques mésophiles, c'est à dire les bactéries lactiques ayant une croissance optimale à 28-37°C, implique au moins une enzyme qui assure l'enchaînement des sucres. Aucun gène chromosomique ou plasmidique de bactéries lactiques mésophiles codant pour une telle enzyme n'a encore été identifié et séquencé, bien que l'on connaisse des plasmides impliqués dans la biosynthèse d'EPS.

WO 92/02142 révèle ainsi l'existence du plasmide pHV67 qui produit dans *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (mésophile) une substance capable d'augmenter la viscosité d'un lait fermenté. US5066588 décrit deux plasmides provenant d'une souche de *Streptococcus cremoris* (mésophile) capable de conférer un caractère épaississant à un *Streptococcus lactis*. De même, Vescovo *et al.* ont mis en évidence un plasmide d'une souche *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (mésophile) codant pour un phénotype Muc+, c'est à dire pour des fonctions liées à la production d'épaississants exocellulaires (Vescovo *et al.*, Biotechnology Letters, Vol II, 709-712, 1989).

Enfin, Van den Berg *et al.* cherchent à isoler d'un *Lactobacillus sake* (mésophile) un groupe de gènes chromosomiques impliqués dans la biosynthèse d'un EPS (Van den Berg D.J.C. *et al.*, First International Conference on Polysaccharide Engineering, Trondheim, Norway, June 6-8, 1994). Cependant aucun gène n'a encore été identifié et/ou séquencé.

D'un autre côté, la biosynthèse d'EPS dans les bactéries lactiques thermophiles, c'est à dire les bactéries lactiques ayant une croissance optimale à 37-45°C, n'est pas encore bien connue. On sait cependant qu'elle n'est pas associée à un plasmide. Vescovo *et al.* ont ainsi montré que le phénotype Muc+ de la souche *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 201 (thermophile) est lié à des fonctions chromosomiques (Vescovo *et al.*, Biotechnology Letters, Vol II, 709-712, 1989).

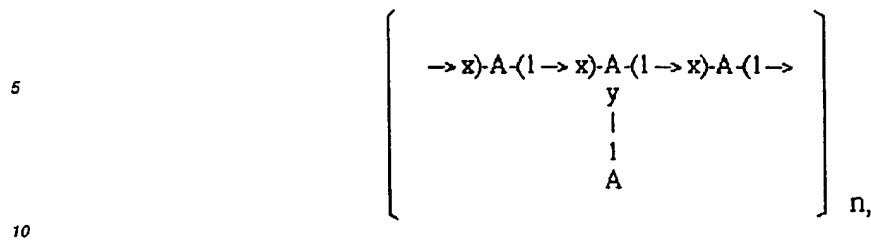
Ainsi à ce jour, aucun gène ou groupe de gènes chromosomiques ou plasmidiques codant pour un EPS de bactéries lactiques mésophiles ou thermophiles n'a été identifié et/ou séquencé.

Il serait donc très intéressant d'avoir des moyens pour restaurer ou stabiliser la production originelle d'EPS dans les bactéries lactiques. De plus, il serait également intéressant d'avoir des moyens pour modifier la structure d'un EPS, et créer de ce fait de nouveaux EPS pouvant avoir des propriétés intéressantes.

Résumé de l'invention

L'invention se destine à fournir des nouveaux moyens pour contrôler, modifier et/ou restaurer la synthèse d'EPS *in-vivo* et *in-vitro*.

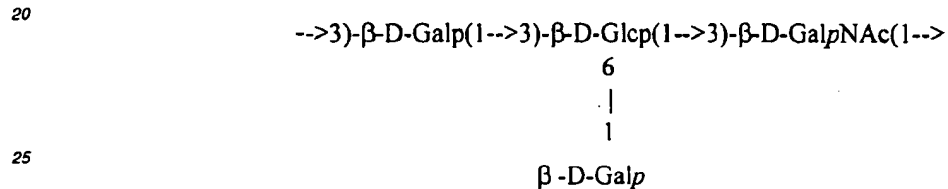
A cet effet, la présente invention concerne tout ADN d'origine chromosomique de bactérie lactique codant pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'EPS présentant la structure répétée



où $n > 1$; A est choisi dans le groupe formé par β -D-Galp, β -D-Glcp et leurs dérivés acétyl et phosphatyl; et x et $y = 2, 3, 4, 5$ ou 6 sachant que $x \neq y$.

15 Un autre objet de la présente invention concerne les vecteurs recombinants comprenant un fragment d'ADN selon la présente invention.

Un autre objet de la présente invention concerne une protéine susceptible d'être impliquée dans la biosynthèse de l'EPS ayant la structure répétée



ladite protéine ayant la séquence en acides aminés choisie dans le groupe formé par les séquences SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, et les séquences homologues (séquences présentées dans la liste de séquences ci-après).

30 Un autre objet de la présente invention concerne une bactérie lactique comprenant, intégré dans son chromosome ou par le moyen d'un plasmide répliquable, un fragment d'ADN selon l'invention.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour les enzymes selon l'invention, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la réplcation autonome ou l'intégration dans une cellule hôte, (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.

35 L'invention concerne aussi un autre procédé de production d'un nouvel EPS dans lequel, (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un EPS, (2) on transforme une bactérie lactique par ledit vecteur, (3) puis on cultive la bactérie lactique transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un nouvel EPS.

40 La présente invention ouvre donc la possibilité d'utiliser des fragments d'ADN selon l'invention pour restaurer ou modifier la production d'EPS dans une bactérie lactique. On peut ainsi envisager d'exprimer ou de surexprimer dans une bactérie lactique l'expression des ADN selon l'invention, pour produire des EPS destinés à épaissir et rendre crémeux des boissons ou de la nourriture comme des desserts liquides, des yogourts, des soupes, des crèmes glacées, des crèmes de café, des sauces ou des mayonnaises, par exemple.

45 La présente invention permet aussi d'avoir des moyens nouveaux pour identifier des gènes chromosomiques de bactéries lactiques impliqués dans la biosynthèse d'EPS.

Enfin, la présente invention fournit aussi de nouvelles enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'EPS décrit ci-dessus. Ces enzymes peuvent être ainsi avantageusement utilisées pour synthétiser ou modifier *in-vitro* un polysaccharide, comme un oligosaccharide ou un EPS, par exemple (Ichikawa Y. et al., American Chemical Society, 114, 9283-9289, 1992).

Description des figures:

55 Figure 1.A. Carte physique de l'opéron impliquée dans la synthèse de l'EPS de la souche *S. thermophilus* CNCM I-1590. Les promoteurs et terminateurs sont respectivement représentés par des drapeaux et des épingles-à-cheveux. La flèche verticale indique la position du site d'insertion du transposon Tn916. Les flèches horizontales indiquent la présence de cadres de lectures (ORF) potentiels. Les noms des gènes correspondants aux ORFs sont

indiqués en dessous des flèches. Les enzymes de restrictions sont représentées de manière abrégée (S=*SacI*; H=*HindIII*; E=*EcoRI*; B=*BamHI*).

Figure 1.B. Représentation des inserts chromosomiques de la souche CNCM I-1590, présents dans les 11 vecteurs pFS. P1, P2 et P3 indiquent la position des sondes qui sont utilisées pendant le criblage.

Figure 1.C. Représentation de l'insert génomique pFS101 comprenant tout l'opéron *eps* du site de restriction *SacI* à *BamHI*; qui est cloné dans pJIM2279.

Figure 2. Représentation de la densité optique à 485nm des fractions de chromatographie par gel-filtration comprenant les sucres produits par la souche *Lactococcus lactis* MG1363 transformée par pFS101 ou pJIM2279. Fraction 9: 2×10^6 Dalton (Da); fractions 11-13: 5×10^5 Da; fractions 14-16: 7.2×10^4 Da; fractions 17-18: 4×10^4 Da; fraction 19 et supérieures: $< 5 \times 10^3$ Da.

Description détaillée de l'invention

Dans la suite de la description, le terme "EPS" désigne un exopolysaccharide produit par une bactérie lactique qui est constitué par l'assemblage de plusieurs sucres différents formant une unité répétitive.

On désigne par les dérivés acétyl et phosphatyl, le galactose ou le glucose comprenant au moins un radical acétyl et phosphatyl aux positions C₂ à C₆ sur le cycle du sucre.

Au sens de la présente invention, on entend par "séquence homologue" toute séquence nucléique ou d'acides aminés ayant une fonction identique, ne différant des séquences selon l'invention que par la substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre de bases nucléiques ou d'acides aminés, par exemple 1 à 500 paires de bases (pb) ou 1 à 150 acides aminés.

Dans ce cadre, on considérera en particulier comme homologues deux séquences d'ADN qui, du fait de la dégénérescence du code génétique, codent pour un même polypeptide. De même, on considérera comme homologues deux protéines fonctionnelles qui sont reconnues par un même anticorps, le rapport des valeurs d'intensité de reconnaissance des deux protéines par l'anticorps n'excédant pas 1000, de préférence 100, par exemple.

On considérera aussi comme séquence homologue, celle qui présente plus de 70% d'homologie avec les séquences selon l'invention, en particulier plus de 80% ou 90%. Dans ce dernier cas, l'homologie est déterminée par le rapport entre le nombre de bases ou d'acides aminés d'une séquence homologue qui sont identiques à celles d'une séquence selon l'invention, et le nombre total de bases ou d'acides aminés de ladite séquence selon l'invention.

Au sens de la présente invention, on entend par "fragment qui s'hybride" tout fragment capable de s'hybrider aux fragments selon l'invention par la méthode de Southern-Blot (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989, chapitres 9.31 à 9.58). De préférence, l'hybridation est conduite dans des conditions stringentes de manière à éviter des hybridations aspécifiques ou peu stables.

Enfin, le terme "fragment" ou "fragment d'ADN" doit être compris comme un ADN double brin d'origine chromosomique, qui peut être synthétisé, reproduit *in-vitro* par exemple par la méthode connue appelée "Polymérase Chain Reaction", ou reproduit *in-vivo* dans une bactérie du type *Escherchia coli*, *Lactococcus lactis*, ou *Streptococcus thermophilus* par exemple.

Pour sélectionner un fragment d'ADN selon la présente invention, il est possible de constituer une banque de grands fragments d'ADN d'une bactérie lactique produisant un EPS dans une bactérie lactique ne produisant pas d'EPS, puis de sélectionner le ou les clone(s) produisant un EPS. Pour cela, on digère l'ADN génomique d'une bactérie lactique produisant un EPS par une enzyme de restriction qui est spécifique d'un site de restriction relativement rare (*BamHI*, *Sall*, *PstI*) ou par une digestion partielle avec *Sau3A*, par exemple. On clone le produit de digestion dans un plasmide d'expression ou d'intégration qui accepte de grands fragments (plasmide pSA3 décrit à l'exemple II), on introduit les plasmides recombinants dans la même espèce de bactérie lactique ne produisant pas d'EPS, on sélectionne au moins un clone transformé produisant un EPS, puis on identifie, on isole et on séquence classiquement le fragment d'ADN responsable de la production d'EPS.

Vu que les fragments d'ADN selon la présente invention sont susceptibles d'être de grande taille, du fait qu'ils peuvent contenir un groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse d'EPS, on peut préférer introduire les plasmides recombinants dans la même souche de bactérie lactique dont proviennent les fragments, à la différence près que cette souche a perdu la capacité de produire des EPS suite à un traitement mutagénique (traitement U.V., chimique ou par transposon).

Une alternative à la méthode décrite ci-dessus peut aussi consister à constituer une banque plasmidique de fragments d'ADN d'une souche de bactérie lactique produisant un EPS, à transformer la même souche de bactérie lactique par les plasmides incapables de s'y répliquer, à sélectionner les transformants ayant intégré un plasmide dans leur génome par recombinaison homologue (sélection par une résistance à un antibiotique, par exemple), à sélectionner les transformants ne produisant plus d'EPS, puis à isoler et séquencer les fragments d'ADN chromosomique des transfor-

mants sélectionnés qui sortent adjacents au plasmide intégré. Pour cela, on peut digérer le chromosome des transformants, le liguer, puis effectuer une PCR-inverse à l'aide de sondes spécifiques du plasmide intégré ou introduire le produit de ligation dans une souche dans laquelle le plasmide recircularisé est capable de se répliquer, par exemple.

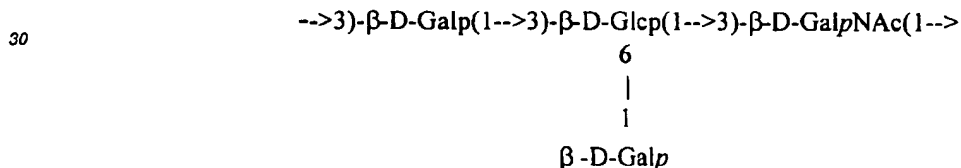
Une autre alternative à la méthode de sélection décrite ci-dessus peut aussi consister à transformer des bactéries 5 lactiques produisant un EPS par un plasmide comprenant un transposon, à soumettre les bactéries à des conditions dans lesquelles le transposon s'excise du vecteur et s'intègre au hasard dans le génome, à sélectionner les clones de bactéries ayant perdu la capacité de produire des EPS, à isoler les fragments d'ADN génomiques desdits clones dans lesquels un transposon s'est intégré. Cette méthode est décrite plus en détail dans l'exemple 1 présenté ci-après.

Il faut remarquer que les méthodes de sélection décrites brièvement ci-dessus peuvent être appliquées à toutes les bactéries lactiques connues, notamment aux bactéries lactiques mésophiles comme par exemple *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* et *Lactobacillus sake*, et les bactéries lactiques thermophiles comme par exemple *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lactobacillus helveticus*. A cet effet, l'homme du métier dispose de techniques de transformation pour chaque espèce de bactérie lactique, et en particulier pour *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Sasaki Y. et al., FEMS Microbiology Reviews, 12, Fourth Symposium on Lactic Acid Bacteria, Noodwijkerhout, The Netherlands, Sept 1993).

De plus, les méthodes de sélection décrites ci-dessus permettent le plus souvent d'isoler seulement une partie d'un gène ou d'un groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse d'un EPS. Néanmoins, l'homme du métier peut facilement identifier la partie restante du gène ou du groupe de gènes en sélectionnant dans une banque chromosomique, à l'aide de sondes nucléiques basées sur un fragment isolé, un ou plusieurs clones renfermant la partie restante, par exemple (voir l'exemple 1.6)

On a pu ainsi caractériser une séquence d'ADN de 15,2 kb de la souche *Streptococcus thermophilus* déposée le 7 juin 1995, auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganisme (C.N.C.M.), Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France, où elle a reçu le numéro de dépôt CNCM I-1590. Par ailleurs, cette souche Gram-positif présente au microscope un aspect de coques non flagellées formant des chaînettes. Cette souche ne fait pas de spores et elle est anaérobe facultative.

Cette séquence de 15,2kb comprend des gènes codant pour des enzymes nouvelles impliquées dans la biosynthèse d'un EPS ayant la structure répétée



Les nucléotides 648 à 15250 de cette séquence de 15,2Kb sont représentés dans la séquence SEQ ID NO:1 donnée dans la liste de séquence ci-après. 13 gènes complets sont délimités dans la séquence nucléique SEQ ID NO:1 40 par les nucléotides 352-1803, 1807-2535, 2547-3239, 3249-3995, 4051-4731, 4898-5854, 6425-7540, 7736-8212, 8221-9192, 9285-10364, 10392-11339, 11302-12222, et 12233-13651.

On a pu montrer que tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 kb permet, suite à une transformation, de restaurer une biosynthèse d'EPS dans une cellule hôte, comme une bactérie lactique mésophile ou thermophile qui initialement n'en produisait pas, notamment dans un *Streptococcus* ou un *Lactococcus*. A titre d'exemple, la séquence d'ADN 45 selon l'invention peut ainsi être utilisée pour restaurer la production d'EPS dans un mutant de la souche *S. thermophilus* CNCM I-1590 n'en produisant plus (mutant naturel ou issu d'une mutagenèse).

Pour restaurer la biosynthèse d'un EPS, on peut intégrer tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 comprenant au moins un des gènes précités dans une cellule hôte au moyen du procédé décrit dans EP564966, ledit procédé étant incorporé par référence dans l'enseignement de la présente invention. En résumé, ce procédé permet de pouvoir (1) transformer la cellule hôte avec un plasmide donneur qui ne s'y réplique pas, ledit plasmide comprenant ledit fragment intégré fonctionnellement (le cadre de lecture est conservé) dans une partie d'un opéron issu de la cellule hôte; (2) identifier les transformants comprenant intégré la totalité du plasmide; (3) sélectionner des transformants comprenant uniquement intégré dans le chromosome le fragment selon l'invention, les autres séquences du plasmide s'étant excisé du chromosome; (4) et cultiver les transformants sélectionnés dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.

On peut noter que ce procédé permet de ne pas utiliser des séquences promoteur et d'activation traductionnelle fonctionnels. De plus, les conditions de culture appropriées pour la production d'EPS sont à la portée de l'homme du métier, qui peut utiliser des milieux de culture standards, et choisir le pH, la température et l'agitation du milieu optimum selon la souche utilisée.

On peut aussi choisir de cloner tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 comprenant au moins un des gènes précités dans un plasmide d'expression autorépliquatif en aval de séquences promoteur et d'activation traductionnelle fonctionnels, et le cas échéant en amont d'un terminateur, puis de transformer une cellule hôte par le plasmide recombinant.

5 Par ailleurs, on peut observer que l'EPS produit par une cellule hôte transformée par la séquence SEQ ID NO:1, par exemple un *Lactococcus lactis* ne produisant pas initialement un EPS, peut être différent de l'EPS qui devrait être normalement synthétisé par les enzymes recombinantes, en l'occurrence l'EPS produit par la souche CNCM I-1590. L'utilisation de tout ou partie de la séquence de 15,2 kb peut donc permettre la création de variants de l'EPS décrit ci-dessus.

10 De même, on a pu montrer que tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 peut aussi permettre, suite à une transformation, de modifier la structure répétée d'un EPS produit initialement par une cellule hôte, par exemple par une bactérie lactique mésophile ou thermophile, notamment un *Streptococcus* ou un *Lactococcus*.

Ces observations ouvrent ainsi la possibilité de réaliser une méthode originale de production d'un nouvel EPS, dans laquelle (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant partiellement ou totalement pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un EPS; (2) on transforme des bactéries lactiques par le vecteur recombinant; 15 (3) on sélectionne le cas échéant une bactérie lactique produisant un nouvel EPS; (4) puis on cultive la bactérie lactique transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un nouvel EPS. De préférence le vecteur code pour les protéines selon l'invention. De plus la bactérie lactique peut produire un autre EPS que celui synthétisé par les protéines codées par ledit vecteur.

20 En particulier, on clone dans un vecteur d'intégration un fragment d'ADN codant partiellement pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un premier EPS, on introduit le vecteur recombinant dans des bactéries lactiques mésophiles ou thermophiles, pouvant le cas échéant produire un deuxième EPS par l'intermédiaire d'un ou plusieurs gènes chromosomiques ou plasmidiques, on isole les bactéries ayant intégrés dans leur chromosome le vecteur d'intégration, puis on sélectionne celles qui produisent un nouvel EPS à cause de l'inactivation d'un ou plusieurs gènes 25 impliqués dans la biosynthèse du deuxième EPS. De préférence, le premier et le deuxième EPS sont identiques, et on choisit un fragment d'ADN codant partiellement (au moins 15 paires de bases) pour au moins une enzyme impliquée dans l'adjonction d'un sucre sur la chaîne latérale de l'unité répétitive ou dans la modification d'un sucre comme une sulfo-, phosphoryl- ou acétyl-transférase, par exemple.

De même, on peut cloner dans un vecteur d'expression répliquatif un fragment d'ADN codant totalement pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un premier EPS, on peut introduire le vecteur recombinant dans 30 des bactéries lactiques mésophiles ou thermophiles, pouvant le cas échéant produire un deuxième EPS par l'intermédiaire d'un ou plusieurs gènes chromosomiques ou plasmidiques, on peut isoler les bactéries renfermant le vecteur répliquatif, puis on peut sélectionner celles qui produisent un nouvel EPS à cause de l'expression d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du premier EPS. De préférence, on choisit des fragments d'ADN codant pour des enzymes impliquées dans la modification d'un sucre comme une sulfo-, phosphoryl- ou acétyl-transférase par exemple, 35 ou dans l'adjonction à l'unité répétitive d'un sucre comme une glucosyl- ou une galactosyl-transférase, par exemple.

De préférence, on utilise totalement ou partiellement au moins un des gènes portés par la séquence SEQ ID NO:1. On peut aussi utiliser au moins un gène plasmidique de bactéries lactiques mésophiles impliqué dans la biosynthèse d'un EPS (gène que l'on peut séquencer à partir de plasmides connus).

40 Enfin, le vecteur recombinant peut être tout fragment d'ADN, simple ou double brin, linéaire ou circulaire, d'expression ou d'intégration, et comprenant une séquence d'ADN selon l'invention notamment tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1. Dans le cas où le procédé décrit dans EP564966 n'est pas utilisé, il faut veiller à ce que le vecteur puisse exprimer l'ADN selon l'invention par des séquences nucléiques adaptées (promoteur; site d'attachement du ribosome; codon préféré), et le cas échéant à ce qu'il comprenne une ou plusieurs origines de répllication de diverses bactéries, 45 notamment d'*Escherichia coli* et/ou d'un *Streptococcus*, par exemple.

L'invention concerne aussi les nouvelles enzymes codées par les gènes de la séquence SEQ ID NO:1, notamment les séquences qui leur sont homologues. On peut ainsi envisager de les utiliser pour modifier ou synthétiser *in-vitro* un oligosaccharide ou un polysaccharide comme un EPS, par exemple. Pour cela, il est préférable de purifier au moins une de ces enzymes, en surexprimant classiquement leur gène dans une bactérie et en les isolant classiquement, par 50 précipitation et/ou chromatographie du milieu de culture, par exemple.

Un autre objet de la présente invention concerne une bactérie lactique comprenant, intégré dans son chromosome ou par le moyen d'un plasmide répliquable, une séquence d'ADN selon l'invention. De préférence, la séquence comprend au moins un des gènes de la séquence SEQ ID NO:1.

L'invention concerne aussi toute utilisation de fragments de la séquence SEQ ID NO:1 ou de fragments du brin 55 complémentaire de cette séquence, d'au moins 15 paires de bases, comme amorce pour faire une PCR ou comme sonde pour détecter *in-vitro* ou inactiver *in-vivo* des gènes de bactéries lactiques impliqués dans la biosynthèse d'un EPS. Cette limite inférieure est arbitrairement fixée du fait que les petits fragments s'hybrident spécifiquement ont généralement une longueur de 15-25 pb.

La présente invention est décrite plus en détail ci-après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se

- 10 - M17 (Difco,USA): tryptone 0,5%, soytone 0,5%, viande hydrolysée 0,5%, extrait de levure 0,25%, acide ascorbique 0,05%, sulphate de magnésium 0,025%, disodium-beta-glycérophosphate 1,9% et de l'eau.
- LM17: milieu M17 comprenant 1% de lactose.
- GM17: milieu M17 comprenant 1% de glucose.
- MSK: lait écrémé (poudre reconstituée à 10%) comprenant 0,1% d'extrait de levure.
- 15 - MAM: lait écrémé (poudre reconstituée à 10%) comprenant 10% d'un mélange d'acides aminés (495 mg/l Ala, 343 mg/l Arg, 682 mg/l Asp, 59 mg/l Cys, 1229 mg/l Glu, 759 mg/l Gly, 153 mg/l His, 215 mg/l Iso, 470 mg/l Leu, 565 mg/l Lys, 122 mg/l Met, 255 mg/l Phe, 436 mg/l Pro, 68 mg/l Ser, 170 mg/l Thr, 61 mg/l Try, 304 mg/l Val ajusté à pH5).
- HJL: tryptone 3%, extrait de boeuf 0,2%, extrait de levure 1%, lactose 1% et KH_2PO_4 pH 6,5 0,5%.
- 20 - Rouge de Ruthénium: extrait de levure 0,5%, lait en poudre écrémé 10%, sucre 1%, agar 1,5% et 0,08g/l de rouge de ruthénium (voir FR2632968).

25 I.1. Sélection d'une souche *S. thermophilus* productrice d'EPS: on cultive les souches de bactéries lactiques de la collection Nestlé dans un milieu liquide HJL et on en étale des dilutions sur un milieu solide Rouge de Ruthénium. Les souches productrices d'EPS demeurent de couleur blanche car les EPS empêchent le colorant de teinter leur paroi cellulaire. Par contre, les souches non-productrices se colorent en rouge du fait de l'affinité du colorant pour le peptidoglycane de leur paroi cellulaire.

1.2. Structure répétée de l'EPS: la structure de l'EPS produit par la souche Sfi6 a été publiée par Doco *et al.* (Carbohyd. Res., 198, 313-321, 1995). Cet EPS présente la composition Glc:Gal:GalNac=1:2:1, et l'unité tétrasaccharidique répétée:



On conjugue la souche Sfi6 résistante à la streptomycine et la souche *Enterococcus faecalis* JH2-2 qui possède un plasmide pAM180 portant le transposon Tn916 (Tn916 est connu pour porter un gène de résistance à la tétracycline; Gawron *et al.*, Nature, 300, 281-283, 1982). Pour cela, on mélange à 1ml d'une culture d'une nuit dans un milieu M17 à 37°C de la souche *E. faecalis* JH2-2, 10ml d'une culture d'une nuit dans un milieu HJL à 42°C de la souche Sfi6, on centrifuge les cellules et on les resuspend dans des tubes contenant 100µl de milieu HJL, on dépose la suspension sur un milieu solide LM17 que l'on incube à 37°C pendant 20h, on récupère les cellules par grattage et on les resuspend dans des tubes de 10 ml de milieu liquide HJL, on incube les tubes à 42°C pendant 4h en les agitant de temps en temps, puis on étale des dilutions des cultures sur un milieu LM17 solide supplémenté de 2,5µg/ml de tétracycline et 2000µg/ml de streptomycine.

I.4. Sélection de mutants de la souche Sfi6 ne produisant plus d'EPS [phénotype EPS(-)]: on transfère les transcon-

jugants résistants sur le milieu solide Rouge de Ruthénium supplémenté par 2,5µg/ml de tetracycline et 2000µg/ml de streptomycine. Environ 10% des transconjugants forment des colonies rouges EPS(-). On sélectionne ensuite environ 800 colonies rouges que l'on cultive une nuit dans des plaques de microtitration comprenant 200µl de milieu HJL supplémenté de 2,5µg/ml de tetracycline. On cultive ensuite 100µl de la culture HJL dans 1ml d'un lait MSK. Environ, 25% des colonies rouges testées présentent un phénotype EPS(-) stable dans le lait (le lait n'est pas épais et filant, et l'analyse du surnageant de culture ne révèle pas d'EPS). Les autres colonies rouges présentent un phénotype EPS(+) ou retrouvent le phénotype EPS(+) après plusieurs sous-cultures dans le lait.

En conclusion, les mutants stables EPS(-) ont perdu leur capacité à produire des EPS à cause de l'intégration du transposon Tn916 dans un gène chromosomique impliqué dans la biosynthèse des EPS. En effet, les mutants stables EPS(-) peuvent retrouver un phénotype EPS(+) lorsqu'on les cultive dans un milieu de croissance dépourvu de tetracycline (excision et perte du transposon).

I.5 Caractérisation de mutants stables EPS(-): on analyse environ 100 mutants stables par Southern-blot d'une préparation d'ADN chromosomique des mutants, digérée par *Hind*III, et hybridation du filtre de Southern-blot avec le gène *tetM* radioactif (code une résistance à la tetracycline) provenant du plasmide pIC182 (Hill *et al.*, Applied and Env. Micro., 54, 1230-1236, 1988). Environ 85% des mutants analysés présentent une bande majoritaire identique correspondant à un locus appelé "locusA". On peut remarquer pour certains des autres mutants deux autres bandes majoritaires (locus B et C) correspondant à des locus connus impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (publication en préparation).

I.6 Caractérisation du locus A: les régions chromosomiques proches du transposon Tn916 intégré peuvent être isolées par une PCR-inverse. Pour cela, on digère classiquement 1µg d'une préparation d'ADN chromosomique d'un mutant choisi arbitrairement (mutant n°1) par *Hind*III pendant 4h, on extrait l'ADN au phénol/chloroforme, on le dilue dans 720µl d'eau, on chauffe l'ADN dilué à 56°C pendant 5 min, on refroidit l'ADN sur de la glace, on lui ajoute 80µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré et 5 unités d'une T4-ligase (Boehringer-Manheim), on l'incube à 12°C pendant 16 h, on le chauffe à 70°C pendant 15 min pour inactiver la ligase, puis on le concentre dans un volume de 100µl par plusieurs extractions successives dans du butanol. On ajoute alors dans un dispositif de PCR 10µl du mélange de ligation, 100pmol d'amorces, 15mM de dNTPs, 10µl de tampon et 0,2 unité de Super-Taq polymérase (Stehlin GmBH). Les amorces nucléiques (ou primers) sont choisies à partir de la séquence connue du transposon Tn916.

En utilisant les amorces ayant la séquence SEQ ID NO:15 et SEQ ID NO:16 on a pu isoler par PCR un fragment de 1kb. De plus, en utilisant les amorces SEQ ID NO:17 et SEQ ID NO:18 on a pu isoler un fragment de 4kb (voir la liste de séquences ci-après).

Un troisième fragment de 0.8kb peut être aussi isolé du mutant n°1, en réalisant une seconde PCR-inverse à partir de son ADN chromosomique digéré par *Rsa*I et à l'aide des amorces ayant la séquence SEQ ID NO:18 et SEQ ID NO:19 (voir la liste de séquence ci-après).

Les fragments de 1kb et de 0.8kb ont été clonés dans le plasmide linéarisé pGEMT (Promega, USA). Le séquençage de ces fragments par la méthode des didéoxynucléotides (kit f-mol® DNA Sequencing System, Promega) montre deux séquences qui, en se recoupant, couvrent trois cadres de lectures ouvertes (ORFs) correspondant aux nucléotides 9933 à 11643 de la séquence SEQ ID NO:1.

Les fragments de 1kb et 4kb ont également été utilisés pour cribler une banque λ-ZAP Express (Stratagene, USA) renfermant des fragments d'ADN de la souche Sfi6. Pour cela, selon les recommandations du fournisseur on digère partiellement une préparation d'ADN dudit mutant par *Sau*3A, on sépare les fragments par une électrophorèse sur gel d'agarose, on coupe du gel les bandes correspondantes à des fragments de 5 à 12kb, on élue l'ADN, puis on le ligue au vecteur λ-ZAP Express préalablement digéré par *Bam*HI. On encapside *in-vitro* le produit de ligation à l'aide du système GigagoldIII (Stratagene), on mélange ensuite les phages avec des *Escherichia coli* XL1Blue (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur, puis on étale le mélange sur boîte de Petri. On analyse ensuite les plaques recombinantes par hybridation de leur ADN transféré sur une membrane Hybond-N (Amersham Life Sciences, UK) avec les fragments de 1kb et 4kb préalablement rendus radioactifs (kit Random Primed DNA Labeling, Boehringer-Manheim).

Parmi 3000 plaques recombinantes, on a pu sélectionner par hybridation environ 20 plaques positives, desquelles on a ensuite isolé les vecteurs λ-ZAP Express, puis excisé les vecteurs pCMV renfermant un insert chromosomique (voir les recommandations du fournisseur Stratagene). Ces vecteurs recombinants sont appelés dans la suite des exemples "pFS".

On a ensuite séquencé les inserts chromosomiques de 11 vecteurs pFS (kit f-mol® DNA Sequencing System), à savoir les vecteurs pFS14, pFS15, pFS26, pFS30, pFS33, pFS49, pFS50, pFS65, pFS73, pFS80 et pFS86 (voir figure 1.B) qui comprennent respectivement des fragments correspondant aux nucléotides de la séquence SEQ ID NO:1, 9314-14602, 1-3159, 7988-11253, 1702-7991, 1361-7229, 4400-8477, 648-7676, 5997-11253, 8474-13489, 3550-7229, et 648-1702.

En recoupant les séquences nucléiques des différents inserts chromosomiques, on a pu ainsi caractériser une séquence de 15,2kb correspondant au locus A de la souche Sfi6 (voir figure 1.A). Les nucléotides 648 à 15250 de cette séquence de 15,2kb sont représentés dans la séquence SEQ ID NO:1.

I.7. Analyse de la séquence SEQ ID NO:1:

La séquence SEQ ID NO:1 comprend la totalité de l'opéron *eps* de la souche Sfi6. Cette séquence comprend 13 ORFs complets, dans la même orientation, que l'on appelle *eps A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M* (voir figure 1.A). Cette séquence comprend en outre 1 ORF complet à l'extrémité 3' de la séquence, qui est codé par le brin complémentaire. Cet ORF, appelé *orfZ*, marque probablement la fin de l'opéron du fait de son orientation inverse par rapport aux autres ORFs.

La comparaison des séquences en acides aminés codées par les 13 premiers ORFs avec celles de protéines présentes dans la banque de donnée Swiss-Prot, à l'aide des logiciels FASTA, PEPLOT et PILEUP de GCG-software, Wisconsin, USA, permet de déduire la fonction des 13 protéines codées par l'opéron *eps*. Les résultats sont présentés ci-après.

L'ORF *epsA* (nucléotides 352-1803) code pour une protéine EpsA (SEQ ID NO:2) ayant 26,4% d'identité avec la protéine LytR de *Bacillus subtilis* qui est impliquée dans la régulation de l'autolysine *N*-acetylmuramoyl-L-alanine (Lazaveric *et al.*, J. Gen. Microbiol., 138, 1949-1961, 1992). EpsA est donc probablement une protéine de régulation de l'opéron *eps*. Par ailleurs, puisqu'un ORF de régulation d'un opéron est généralement trouvé en amont des autres ORFs, le gène *epsA* est probablement le premier gène de l'opéron *eps*. Ceci est confirmé par le fait qu'un terminateur est trouvé aux nucléotides 230-252, un promoteur aux nucléotides 274-302, et un site d'attachement des ribosomes aux nucléotides 340-345 de la séquence SEQ ID NO:1.

Le gène *epsB* (nucléotides 1807-2535) code pour une protéine EpsB (SEQ ID NO:3) ayant 67,5% d'identité avec la protéine CpsA de *Streptococcus agalactiae* et 30% d'identité avec la protéine CapC de *Staphylococcus aureus* (Rubens *et al.*, Mol. Microbiol., 8, 843-885, 1993; Lin *et al.*, J. Bacteriol., 176, 7005-7016, 1994). La fonction précise de ces gènes est encore inconnue, en dehors du fait qu'ils sont essentiels pour la synthèse de la capsule qui est constituée de polysaccharides accrochés aux phospholipides de la membrane externe des bactéries.

Le gène *epsC* (nucléotides 2547-3239) code pour une protéine EpsC (SEQ ID NO:4) ayant 52% d'identité avec la protéine CpsB de *Streptococcus agalactiae* qui est impliquée dans la synthèse de la capsule (Rubens *et al.*). EpsC a aussi 23% d'identité, 49% de similarité, et un profil d'hydrophobicité comparable à celui des protéines CLD de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* (Batchelor *et al.*, J. Bacteriol., 174, 5228-5236, 1992; Bastin *et al.*, Mol. Microbiol., 7, 725-734, 1993). Il faut remarquer que les protéines CLD sont impliquées dans le contrôle de la longueur des chaînes de polysaccharides lors de leur biosynthèse.

Le gène *epsD* (nucléotides 3249-3995) code pour une protéine EpsD (SEQ ID NO:5) ayant 60,5% d'identité avec la protéine CpsC de *Streptococcus agalactiae*, ayant 34,5% d'identité avec la protéine CapA de *Staphylococcus aureus*, et ayant 33% d'identité avec la protéine ExoP de *Rhizobium meliloti* (Rubens *et al.*; Lin *et al.*; Becker *et al.*, Mol. Gen. Genet., 241, 367-379, 1993). La protéine ExoP est une protéine de membrane qui est impliquée dans la translocation d'EPS et/ou de précurseurs d'EPS.

Le gène *epsE* (nucléotides 4051-4731) code pour une protéine EpsE (SEQ ID NO:6) présentant des homologies significatives avec de nombreuses protéines ayant une activité galactosyl-transférase (Rubens *et al.*). Ce gène code donc probablement pour une galactosyl-transférase.

On peut remarquer que les gènes *epsB, C, D, E* de *S. thermophilus* Sfi6 sont similaires à ceux de l'opéron de *S. agalactiae* comprenant les gènes *cpsA, B, C, D* (Rubens *et al.*). De plus, ils sont organisés de la même façon. Bien que les polysaccharides de capsule et l'EPS des deux souches soient très différents, ceci indique qu'une région chromosomique a été probablement transférée entre ces deux espèces.

Le gène *epsF* (nucléotides 4898-5854) code pour une protéine EpsF (SEQ ID NO:7) ayant respectivement 24,5% et 23% d'identité avec les protéines CapH et CapM de *S. mutans* qui sont impliquées probablement en tant que glycosyl-transférases dans la biosynthèse de la capsule (Lin *et al.*).

Le gène *epsG* (nucléotides 6425-7540) code pour une protéine EpsG (SEQ ID NO:8) ayant 20,5% d'identité et 50% de similarité avec la *N*-acétylglucoseamine-transférase de *Salmonella typhimurium* LT2 qui est impliquée dans la biosynthèse du polysaccharide LPS de la membrane externe (Mac Lachlan *et al.*, J. Bacteriol., 173, 7151-7163, 1991). Du fait qu'une *N*-acétylglucosamine n'est pas impliquée dans la biosynthèse de l'EPS de la souche Sfi6 (il n'y a pas de glucose acétylé), le gène *epsG* code probablement pour une glucosyl-transférase, une *N*-acétylgalactosyl-transférase, ou une *N*-acétylglucosyl-transférase ayant une activité *N*-acétylglucosamine-épimérase.

Le gène *epsH* (nucléotides 7736-8212) code pour une protéine EpsH (SEQ ID NO:9) ayant de fortes homologies avec des acétyl-transférases NodL-LacA-CysE (Downie *et al.*, Mol. Microbiol., 3, 1649-1651, 1989). De ce fait la protéine EpsH pourrait être une acétyl-transférase impliquée dans la biosynthèse de la *N*-acétylgalactosamine de l'EPS.

Le gène *epsI* (nucléotides 8221-9192) code pour une protéine EpsI (SEQ ID NO:10) ayant 24% d'identité avec une protéine, codée par un l'ORF RfbV du cluster *rfb* de *Salmonella typhimurium*, qui est probablement une glycosyl-transférase (Jiang *et al.*; Liu *et al.*, J. Bacteriol., 177, 4084-4088, 1995).

Le gène *epsJ* (nucléotides 9285-10364) code pour une protéine EpsJ (SEQ ID NO:11) ayant 20% d'identité et un profil d'hydrophobicité comparable à celui d'une protéine d'un ORF du cluster *rfb* de *Salmonella enterica* qui est lui-même similaire à une polymérase de l'antigène O des salmonelles du groupe B et C2 (Lee *et al.*, J. Gen. Microbiol.,

138, 1843-1855, 1992; Morona *et al.*, J. Bacteriol. **176**, 733-747, 1994). Le gène *epsJ* pourrait donc coder une EPS-polymérase qui polymériserait l'unité tétrasaccharide de l'EPS.

Le gène *epsK* (nucléotides 10392-11339) code pour une protéine EpsK (SEQ ID NO:12) ayant 18% d'identité et 42% de similarité avec la protéine, codée par le gène *lipB* de *Neisseria meningitidis*, qui est impliquée dans la biosynthèse de la capsule en accrochant des polysaccharides aux phospholipides de la membrane externe (Frosch *et al.*, Mol. Microbiol., **8**, 483-493, 1993). Sachant que les *S. thermophilus* n'ont pas de membrane externe (Gram-positif), le gène *epsK* pourrait donc coder une enzyme impliquée dans l'accrochage des EPS aux phospholipides de la membrane cellulaire, qui de concert avec un transporteur d'EPS (probablement EpsC et EpsD) et une enzyme qui détache les EPS, participerait au transport de l'EPS à travers la membrane (modèle en accord avec celui présenté par Frosch *et al.*).

Par ailleurs, on peut remarquer que le transposon Tn916 est intégré dans le gène *epsK* du mutant n°1 utilisé pour identifier l'opéron *eps* (voir le point I.6 ci-dessus), entre les nucléotides 10540-10541 de la séquence SEQ ID NO:1.

Le gène *epsL* (nucléotides 11302-12222) code pour une protéine EpsL (SEQ ID NO:14) qui ne présente aucune homologie avec des protéines connues. Les 38 premiers nucléotides sont couverts par l'extrémité 3' de *epsK*, ce qui laisse supposer une expression coordonnée des deux protéines, et une activité de la protéine EpsL dans le transport membranaire de l'EPS.

Le gène *epsM* (nucléotides 12233-13651) code pour une protéine EpsM (SEQ ID NO:13) qui ne présente aucune homologie avec des protéines connues de la banque de données Swiss-prot. Ce gène est certainement impliqué dans la biosynthèse de l'EPS de la souche Sfi6 car il n'y a pas, en amont, un promoteur spécifique pour ce gène.

Le gène *orfZ* (13732-14305 sur le brin complémentaire) est présent en orientation inverse par rapport au reste des ORFs de l'opéron *eps*. De ce fait, il n'est probablement pas impliqué dans la biosynthèse de l'EPS de la souche Sfi6. De plus, il ne présente aucune homologie avec des protéines connues de la banque de données Swiss-prot.

En conclusion, les inserts chromosomiques isolés des 11 vecteurs pSF (voir le point I.6 ci-dessus) couvrent une région chromosomique de la souche *S. thermophilus* Sfi6 qui est manifestement impliquée dans la biosynthèse de l'EPS. On a pu ainsi identifier 13 gènes complets qui comprennent en amont un promoteur délimitant le début de l'opéron *eps*.

Exemple II: inactivation du gène *epsJ*

On inactive par recombinaison homologue le gène *epsJ* de l'opéron *eps* pour confirmer son importance dans la biosynthèse de l'EPS.

Pour cela, on isole un fragment *DraI-SalI* du plasmide pGEMT renfermant le fragment de PCR de 0.8 kb (voir l'exemple I.6 ci-dessus), on le ligue dans le plasmide thermosensible pSA3 (Dao *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., **49**, 115-119, 1985) préalablement digéré par *EcoRV* et *SalI*, on transforme la souche *E. coli* XL1-blue par le produit de ligation, on sélectionne des transformants, on isole un plasmide recombinant, puis on transforme par électroporation la souche *S. thermophilus* Sfi6 avec le plasmide recombinant au moyen d'une méthode adaptée de celle décrite par Slos *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1333-1339, 1991). On resuspend les cellules soumises à une décharge de 2,1kV, 25µF et 400Ω dans 1ml de milieu HJL que l'on incube 4h à 37°C (température permissive), on étale les cellules sur un milieu solide LM17 supplémenté de 2,5µg/ml d'erythromycine que l'on incube 16h à 37°C, puis on sélectionne les colonies transformées qui survivent. On incube ensuite les colonies sélectionnées dans 2 ml de milieu HJL supplémenté de 2,5µg/ml d'erythromycine jusqu'à ce que la densité optique à 600nm (DO₆₀₀) de la culture atteigne 0,2, on soumet la culture à 45°C jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 1.0 (le plasmide ne se réplique plus), puis on étale des dilutions de la culture sur un milieu LM17 solide supplémenté de 2,5µg/ml d'erythromycine que l'on incube 12h à 45°C.

Les colonies qui survivent ont intégré dans le gène *epsJ* le plasmide pSA3 recombinant. Ceci peut être vérifié par Southern-Blot d'une préparation d'ADN chromosomique des colonies survivantes digérée par *EcoRI* (coupe une seule fois dans pSA3), et hybridation du filtre de Southern-Blot avec le fragment radioactif précité *DraI-SalI*. Les colonies ayant intégré le plasmide pSA3 présentent deux bandes sur le filtre de Southern-Blot. De plus, les colonies ayant intégré dans *epsJ* le plasmide pSA3 recombinant présentent un phénotype EPS(-) sur un milieu solide Rouge de Ruthénium, et ont perdu leur caractère filant dans un lait MSK (voir l'exemple I.4 ci-dessus).

Exemple III: inactivation des gènes *eps A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M*

On a montré aux exemples I et II que l'inactivation des gènes *epsK* et *epsJ*, par insertion d'un transposon ou d'un plasmide intégratif, interrompt la biosynthèse d'EPS dans la souche Sfi6.

De même, on peut inactiver par recombinaison homologue les autres gènes de l'opéron *eps* de la souche Sfi6, et observer ainsi une interruption de la biosynthèse d'EPS. Pour cela, on amplifie par PCR un fragment d'un ORF provenant d'un des 11 vecteurs pFS décrits à l'exemple I.6 ci-dessus. On le clone dans le plasmide pSA3, puis on le transforme et on l'intègre à la souche Sfi6 dans les mêmes conditions que celles décrites à l'exemple précédent.

Exemple IV: restauration de la production d'EPS

On coupe par *EcoRI* pFS30, on sépare les fragments, on ligue le fragment de 5.5 kb à pFS14 préalablement digéré par *EcoRI*, on transforme des cellules XL1-blue par le produit de ligation, on sélectionne des clones transformés présentant une bonne orientation des inserts, on isole un plasmide appelé pFS30-14, on ligue un fragment *EcoRI* central de pFS65 à pFS30-14 préalablement coupé par *EcoRI*, on transforme des cellules XL1-blue par le produit de ligation, puis on sélectionne des clones transformés présentant une bonne orientation des inserts. Le plasmide recombinant résultant, appelé pFS30-65-14, comprend les nucléotides 1702 à 14602 de la séquence SEQ ID NO:1.

On coupe ensuite pFS30-65-14 par *Sall* et *SmaI*, on sépare le fragment de 12.9 kb, on le ligue à pSA3 préalablement coupé par *EcoRV* et *Sall*, on transforme des cellules XL1-blue par le produit de ligation, on sélectionne des clones transformés, et on isole des plasmides pSA3 recombinants.

On transforme par électroporation la souche *S. thermophilus* CNCM I-1292 déposée le 29 mars 1993 par les plasmides pSA3 recombinants. Cette souche Gram-positive présente au microscope un aspect de coques non flagellées formant des chaînettes, elle ne fait pas de spores, elle est anaérobe facultative, elle ne produit pas d'EPS, et elle présente dans son génome 1000 pb correspondant à l'extrémité 5' de l'opéron *eps*. Le plasmide pSA3 recombinant peut donc s'intégrer dans le génome de la souche CNCM I-1292. Certains des clones transformés présentent un phénotype EPS(+) sur un milieu solide Rouge de Ruthénium, et un caractère filant dans un lait MSK.

Exemple V restauration de la production d'EPS

On digère le chromosome de la souche Sfi6 par des enzymes qui ne coupent pas dans la séquence SEQ ID NO:1 (*BamHI*, *Sall*, *NruI*, *StuI*), on sépare le produit de digestion sur un gel d'agarose, on élue les bandes de 15-25 kb, on les ligue dans pSA3 préalablement coupé par une enzyme de restriction appropriée, on transforme par électroporation la souche *S. thermophilus* CNCM I-1292, puis on sélectionne des transformants par transferts des colonies sur un filtre suivi d'une hybridation de leur ADN avec l'insert de pFS14 rendu préalablement radioactif. Certains des clones transformés présentent un phénotype EPS(+) sur un milieu solide Rouge de Ruthénium, et un caractère filant dans un lait MSK.

Exemple VI modification d'un EPS

On transforme par électroporation la souche *S. thermophilus* CNCM I-1422, déposée le 18 mai 1994, par le plasmide pSA3 recombinant de l'exemple V. Cette souche Gram-positive présente au microscope un aspect de coques non flagellées formant des chaînettes, elle ne fait pas de spores, elle est anaérobe facultative, et elle produit un EPS ayant la composition Glc:Gal=2:2.

Exemple VII modification d'un EPS

On transforme par électroporation la souche *S. thermophilus* CNCM I-1351, déposée le 5 août 1993, par le plasmide pSA3 recombinant de l'exemple V. Cette souche Gram-positive présente au microscope un aspect de coques non flagellées formant des chaînettes, elle ne fait pas de spores, elle est anaérobe facultative, et elle produit un EPS ayant la composition Glc:Gal:Rha=1:3:2.

Exemple VIII modification d'un EPS

On isole de l'ADN chromosomique de la souche CNCM I-1590 par la méthode de Slos *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1333-1339, 1991). On digère la préparation d'ADN par *SacI* et *BamHI*, on sépare les fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%, on élue les fragments de 12 à 16kb, on ligue l'ADN extrait au vecteur pJIM2279 (obtenu de P. Renault, INRA, Jouy-en-Josas, Paris, France) préalablement digéré par *SacI* et *BamHI* puis déphosphorylé. On transforme la souche *Lactococcus lactis* MG1363 (J. Bacteriol., **154**, 1-9, 1983), cultivée sur milieu GM17 à 30°C, par la méthode de De Vos *et al.* (Gene, **85**, 169-176, 1989). On sélectionne les clones transformés par hybridation du DNA génomique des clones avec l'une des sondes ayant la séquence SEQ ID NO:15, 16, 17, 18 et 19. Parmi 400 transformants, 6 clones positifs sont sélectionnés, dont 1 comprend un plasmide appelé pFS101 représenté à la figure 1.C.

Pour déterminer si le plasmide pFS101 est capable d'induire la production d'EPS recombinant, *L. lactis* MG1363 est retransformé par pFS101, et directement étalé sur le milieu solide rouge de ruthénium. A titre de comparaison, *L. lactis* MG1363 est transformé par le plasmide pJIM2279 puis est directement étalé sur le milieu solide rouge de ruthénium. Les résultats montrent que toutes les colonies comprenant pJIM2279 ont un phénotype rouge (3000 colonies EPS(-)), tandis que plus de 99,5% des colonies comprenant pFS101 ont un phénotype blanc (800 colonies EPS(+), à l'exception de 2 colonies). La souche *L. lactis* MG1363 transformé par pFS101 produit donc un EPS recombinant.

On fait produire l'EPS de la souche *L. lactis* MG1363 transformée par pFS101, en la cultivant dans le milieu MAM, à un pH de 5,5, à 30°C sous agitation magnétique de 60 rotation par minute. On isole l'EPS recombinant en mélangeant le milieu de culture à 40% d'acide trichloro-acétique, en centrifugeant le mélange 20 min à 8000g, en mélangeant un volume égal d'acétone au précipité, en incubant le tout à 4°C pendant 12h, en précipitant le mélange à 10000g pendant 1h, en mettant en suspension le précipité dans de l'eau, en ajustant le pH du mélange à 7, en le dialysant contre de l'eau pendant 24h, en l'ultracentrifugeant à 100000g pendant 1h, en récupérant le surnageant, puis en lyophilisant le surnageant. A titre de comparaison, on cultive la souche *L. lactis* MG1363 transformée par pJIM2279 dans les mêmes conditions et on isole les sucres de la même manière.

On détermine la quantité de sucres neutres totaux par la méthode de Dubois *et al.* (Anal. Chem., 28, 350-356, 1956). Les résultats montrent que la souche transformée par pFS101 produit 10mg/l de sucres, exprimé en glucose équivalent, tandis la souche transformée par pJIM2279 produit des traces de sucre (< 1mg/l).

On estime le poids moléculaire de l'EPS recombinant par chromatographie sur une colonne de gel-filtration Superose-6 (Pharmacia) qui est connectée au système FPLC (Pharmacia) préalablement calibré avec du dextran commercial (Sigma) de 2×10^6 à 5×10^3 Dalton (Da). Pour cela, on dépose sur la colonne 0,25 à 1ml d'un échantillon comprenant 250µg de sucres neutres, on l'élue par un flux de 0,5ml/min dans un tampon phosphate 50mM pH7,2. Pour comparaison, de la même manière on sépare les sucres produits par la souche transformée par pJIM2279. Les résultats présentés à la figure 2 montrent que la souche transformée par pJIM2279 produit une petite quantité de polysaccharides hétérogènes ayant certainement pour origine la paroi cellulaire ($2-0,5 \times 10^6$ Da; fractions 8-15) et une grande quantité d'oligosaccharides de petits poids moléculaires (mono- et di-saccharides; fractions 20-22). Par contre, la souche transformée par pFS101 présente manifestement un EPS recombinant de haut poids moléculaire d'environ 2×10^6 Da (fraction 9).

On détermine la composition en sucres de l'EPS recombinant par chromatographie en phase gazeuse par la méthode de Neeser *et al.* (Anal. Biochem., 142, 58-67, 1984). Les résultats montrent que le milieu de culture de la souche transformée par pFS101 comprend en molarité un ratio 1:3 de Glc:Gal. On peut détecter des traces de rhamnose issues de la paroi cellulaire. Par contre, on ne détecte pas de GalNac.

La composition de l'EPS produit par la souche *L. lactis* MG1363 transformée par pFS101 est donc différente de celle de l'EPS produit par la souche *S. thermophilus* CNCM I-1590. On peut raisonnablement estimer que la structure de l'EPS recombinant est la même que celle de l'EPS de la souche CNCM I-1590, à la différence près que le GalNac est remplacé par un galactose.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
 (B) RUE: AVENUE NESTLE 55
 (C) VILLE: VEVEY
 (D) ETAT OU PROVINCE: CANTON DE VAUD
 (E) PAYS: SUISSE
 (F) CODE POSTAL: 1800
 (G) TELEPHONE: (41) 21 924 4760
 (H) TELECOPIE: (41) 21 924 2880

(ii) TITRE DE L' INVENTION: BACTERIES LACTIQUES PRODUISANT DES EPS

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 19

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 14602 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 352..1803
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsA"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 1807..2535
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsB"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 2547..3239
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsC"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 3249..3995
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsD"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 4051..4731
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 4898..5854
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsF"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 6425..7540
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsG"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 7736..8212
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsH"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 8221..9192
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsI"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 9285..10364
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsJ"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 10392..11339
 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "epsK"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc feature
 (B) EMBLACEMENT: 11302..12222

5

10

15

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLB: RBS
(B) EMPLACEMENT: 340..345

20

GTGATAATAA GTTAAAATTT TTCAAACCTAC TAGAAAAAAT AAAAATATTT GGAAGAAGAA 120

GATAGTTCAC AATATAATGG AAAATGATAT AAATTAAATG ATTGATATCA TAATGAAAAA 240

25

TCG CGT ACG AAT CGT AAG CAA AAG CAT ACG AGT AAT GGA TCG TGG GGG 405
Ser Arg Thr Asn Arg Lys Gln Lys His Thr Ser Asn Gly Ser Trp Gly

ATG GTC AAC GTT GGG TTG ACC ATC CTG TAT GCT ATT TTA GCA TTG GTC 453
Met Val Asn Val Gly Leu Thr Ile Leu Tyr Ala Ile Leu Ala Leu Val
20 25 30

TTA TTA TTC ACC ATG TTC AAT TAT AAT TTC CTA TCC TTT AGG TTT TTG 501
Leu Leu Phe Thr Met Phe Asn Tyr Asn Phe Leu Ser Phe Arg Phe Leu
35 40 45 50

AAC ATC ATT ATC ACC ATT GGT TTG TTG GTA GTT CTT GCT ATT AGC ATC 549
Asn Ile Ile Ile Thr Ile Gly Leu Leu Val Val Leu Ala Ile Ser Ile

TTC CTT CAG AAG ACT AAG AAA TTA CCA CTA GTG ACA ACG GTT GTA CTG 597
Phe Leu Gln Lys Thr Lys Lys Leu Pro Leu Val Thr Thr Val Val Leu

GTT ATC TTC TCG CTA GTT TCT CTG GTT GGT ATT TTT GGT TTT AAA CAA 645
Val Ile Phe Ser Leu Val Ser Leu Val Gly Ile Phe Gly Phe Lys Gln
85 90 95

ATG ATT GAC ATC ACT AAC CGT ATG AAT CAG ACA GCA GCA TTT TCT GAA 693
Met Ile Asp Ile Thr Asn Arg Met Asn Gln Thr Ala Ala Phe Ser Glu

GTA GAA ATG AGC ATC GTG GTT CCT AAG GAA AGT GAC ATC AAA GAT GTG 741
Val Glu Met Ser Ile Val Val Pro Lys Glu Ser Asp Ile Lys Asp Val
115 120 125 130

AGC CAG CTT ACT AGC GTA CAG GCA CCT ACT AAG GTT GAT AAG AAC AAT 789
Ser Gln Leu Thr Ser Val Gln Ala Pro Thr Lys Val Asp Lys Asn Asn
135 140 145

ATC GAG ATC TTG ATG TCA GCT CTC AAA AAA GAT AAA AAA GTT GAT GTT 837

EP 0 750 043 A1

	Ile	Glu	Ile	Leu	Met	Ser	Ala	Leu	Lys	Lys	Asp	Lys	Lys	Val	Asp	Val	
				150					155					160			
5	AAA Lys	GTT Val	GAT Asp	GAT Asp	GTT Val	GCC Ala	TCA Ser	TAT Tyr	CAA Gln	GAA Glu	GCT Ala	TAT Tyr	GAT Asp	AAT Asn	CTC Leu	AAG Lys	885
			165					170					175				
	TCT Ser	GGC Gly	AAA Lys	TCT Ser	AAA Lys	GCT Ala	ATG Met	GTC Val	TTG Leu	AGT Ser	GGC Gly	TCT Ser	TAT Tyr	GCT Ala	AGC Ser	CTA Leu	933
			180				185					190					
10	TTA Leu	GAG Glu	TCT Ser	GTC Val	GAT Asp	AGT Ser	AAT Asn	TAT Tyr	GCT Ala	TCA Ser	AAT Asn	CTA Leu	AAA Lys	ACA Thr	ATT Ile	TAT Tyr	981
						200					205					210	
	ACT Thr	TAT Tyr	AAA Lys	ATT Ile	AAA Lys	AAG Lys	AAG Lys	AAT Asn	AGC Ser	AAC Ser	TCT Ser	GCA Ala	AAC Asn	CAA Gln	GTA Val	GAT Asp	1029
					215					220					225		
15	TCA Ser	AGA Arg	GTC Val	TTC Phe	AAT Asn	ATT Ile	TAT Tyr	ATT Ile	AGT Ser	GGT Gly	ATT Ile	GAT Asp	ACC Thr	TAC Tyr	GGT Gly	CCG Pro	1077
				230					235					240			
	ATT Ile	TCA Ser	ACA Val	GTG Val	TCA Ser	CGT Arg	TCA Ser	GAT Asp	GTC Val	AAT Asn	ATC Ile	ATT Ile	ATG Met	ACA Thr	GTA Val	AAC Asn	1125
			245					250					255				
20	ATG Met	AAT Asn	ACA Thr	CAT His	AAG Lys	ATT Ile	CTC Leu	TTG Leu	ACG Thr	ACT Thr	ACT Thr	CCA Pro	CGT Arg	GAT Asp	GCA Ala	TAC Tyr	1173
							265					270					
	GTT Val	AAG Lys	ATT Ile	CCT Pro	GGT Gly	GGT Gly	GGG Ala	GCA Asp	GAC Gln	CAG Tyr	TAT Asp	GAT Asp	AAA Lys	TTA Leu	ACC Thr	CAC His	1221
			275			280				285						290	
25	GCA Ala	GGT Gly	ATT Ile	TAT Tyr	GGC Gly	GTT Val	GAA Glu	ACA Thr	TCT Ser	GAA Glu	CAA Gln	ACT Thr	CTA Leu	GAA Glu	GAT Asp	CTT Leu	1269
					295				300					305			
	TAT Tyr	GGT Gly	ATT Ile	AAG Lys	CTT Leu	GAT Asp	TAC Tyr	TAT Tyr	GCA Ala	CGA Arg	ATT Ile	AAC Asn	TTC Phe	ACA Thr	TCT Ser	TTC Phe	1317
				310					315					320			
30	CTT Leu	AAG Lys	TTG Leu	ATT Ile	GAC Asp	CAA Gln	CTT Leu	GGT Gly	GGT Gly	GTG Val	ACA Thr	GTC Val	CAT His	AAT Asn	GAT Asp	CAA Gln	1365
				325				330					335				
	GCT Ala	TTC Phe	ACA Thr	CAA Gln	GAG Glu	AAG Lys	TTT Phe	GAT Asp	TTC Phe	CCG Pro	GTT Val	GGA Gly	GAT Asp	ATC Ile	CAA Gln	ATG Met	1413
							345					350					
35	AAT Asn	TCA Ser	GAG Glu	CAA Gln	GCA Ala	CTT Leu	GGA Gly	TTT Phe	GTT Val	CGT Arg	GAA Glu	CGC Arg	TAT Tyr	AAT Asn	TTA Leu	GAT Asp	1461
						360					365					370	
	GGC Gly	GGA Gly	GAT Asp	AAT Asn	GAC Asp	CGT Arg	GGT Gly	AAA Lys	AAC Asn	CAG Gln	GAG Glu	AAA Lys	GTT Val	ATT Ile	TCT Ser	GCG Ala	1509
					375					380					385		
40	ATT Ile	TTA Leu	AAC Asn	AAG Lys	TTG Leu	GCT Ala	TCT Ser	CTA Leu	AAA Lys	TCT Ser	GTA Val	TCA Ser	AAC Asn	TTT Phe	ACT Thr	TCA Ser	1557
					390				395					400			
	ATC Ile	GTT Val	AAT Asn	AAT Asn	CTC Leu	CAA Gln	GAC Asp	TCT Ser	GTC Val	CAA Gln	ACG Thr	AAT Asn	ATG Met	TCT Ser	TTG Leu	AAT Asn	1605
				405				410					415				
	ACC Thr	ATT Ile	AAC Asn	GCT Ala	TTG Leu	GCT Ala	AAT Asn	ACA Thr	CAA Gln	CTT Leu	GAA Glu	TCA Ser	GGT Gly	TCT Ser	AAA Lys	TTT Phe	1653
				420			425					430					
50	ACG Thr	GTG Val	ACT Thr	TCT Ser	CAA Gln	GCA Ala	GTA Val	ACA Thr	GGT Gly	ACA Thr	GGT Gly	TCA Ser	ACC Thr	GGA Gly	CAA Gln	TTG Leu	1701
						440					445					450	
55																	

EP 0 750 043 A1

	ATC	TCT	TAT	GCG	ATG	CCA	AAT	TCT	AGT	CTT	TAC	ATG	ATG	AAA	CTA	GAT	1749
	Ile	Ser	Tyr	Ala	Met	Pro	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	Met	Met	Lys	Leu	Asp	
					455					460					465		
5	AAT	TCG	AGT	GTG	GAA	AGT	GCC	TCT	CAA	GCT	ATC	AAA	AAA	TTG	ATG	GAG	1797
	Asn	Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Ser	Gln	Ala	Ile	Lys	Lys	Leu	Met	Glu	
				470					475					480			
	GAA	AAA	TAA	GTG	ATT	GAC	GTT	CAC	TCA	CAT	ATT	GTT	TTT	GAT	GTT	GAT	1845
	Glu	Lys		Val	Ile	Asp	Val	His	Ser	His	Ile	Val	Phe	Asp	Val	Asp	
				1				5					10				
10	GAT	GGT	CCT	GAA	ACT	TTA	GAA	GAA	AGT	TTA	GAC	CTC	ATT	GGT	GAA	AGT	1893
	Asp	Gly	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Gly	Glu	Ser	
		15				20						25					
	TAC	GCC	CAG	GGG	GTA	CGT	AAG	ATT	GTT	TCA	ACA	TCC	CAT	CGT	CGT	AAG	1941
	Tyr	Ala	Gln	Gly	Val	Arg	Lys	Ile	Val	Ser	Thr	Ser	His	Arg	Arg	Lys	
15		30				35					40					45	
	GGG	ATG	TTT	GAG	ACT	CCA	GAG	GAT	AAA	ATT	TTT	GCC	AAC	TTT	AAA	AAA	1989
	Gly	Met	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Asp	Lys	Ile	Phe	Ala	Asn	Phe	Lys	Lys	
				50					55					60			
	GTA	AAA	GCA	GAA	GCA	GAA	GCA	CTT	TAT	CCA	GAC	TTA	ACT	ATT	TAT	TAT	2037
	Val	Lys	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Leu	Tyr	Pro	Asp	Leu	Thr	Ile	Tyr	Tyr	
20				65					70					75			
	GGA	GGT	GAA	CTT	TAT	TAC	ACC	TCA	GAC	ATT	GTG	GAG	AAA	CTT	GAA	AAG	2085
	Gly	Gly	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Asp	Ile	Val	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	
			80					85				90					
	AAT	CTC	ATT	CCG	CGC	ATG	CAC	AAC	ACT	CAA	TTT	GCT	TTA	ATT	GAG	TTT	2133
	Asn	Leu	Ile	Pro	Arg	Met	His	Asn	Thr	Gln	Phe	Ala	Leu	Ile	Glu	Phe	
25		95					100					105					
	AGT	GCT	CGC	ACA	TCT	TGG	AAA	GAA	ATT	CAT	AGT	GGG	CTT	AGT	AAT	GTT	2181
	Ser	Ala	Arg	Thr	Ser	Trp	Lys	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Leu	Ser	Asn	Val	
		110				115					120					125	
	TTG	AGA	GCG	GGG	GTA	ACG	CCT	ATT	GTT	GCT	CAT	ATT	GAG	CGC	TAT	GAT	2229
	Leu	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	His	Ile	Glu	Arg	Tyr	Asp	
30				130						135				140			
	GCC	CTC	GAA	GAA	AAT	GCT	GAC	CGT	GTT	CGA	GAA	ATC	ATC	AAT	ATG	GGC	2277
	Ala	Leu	Glu	Glu	Asn	Ala	Asp	Arg	Val	Val	Arg	Glu	Ile	Ile	Asn	Met	
				145					150					155			
	TGC	TAT	ACT	CAA	GTC	AAT	AGC	TCA	CAT	GTC	CTC	AAA	CCA	AAG	CTC	TTT	2325
	Cys	Tyr	Thr	Gln	Val	Asn	Ser	Ser	His	Val	Leu	Lys	Pro	Lys	Leu	Phe	
35			160				165					170					
	GGA	GAT	AAA	GAT	AAA	GTA	AGA	AAG	AAA	CGT	GTT	CGC	TTT	TTC	TTG	GAG	2373
	Gly	Asp	Lys	Asp	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Arg	Val	Arg	Phe	Phe	Leu	Glu	
		175				180						185					
40	AAA	AAT	TTG	GTT	CAT	ATG	GTT	GCT	AGC	GAC	ATG	CAT	AAT	CTT	GGG	CCG	2421
	Lys	Asn	Leu	Val	His	Met	Val	Ala	Ser	Asp	Met	His	Asn	Leu	Gly	Pro	
		190				195					200				205		
	AGA	CCA	CCA	TTT	ATG	AAA	GAT	GCT	TAT	GAA	ATT	GTT	AAA	AAG	AAC	TAC	2469
	Arg	Pro	Pro	Phe	Met	Lys	Asp	Ala	Tyr	Glu	Ile	Val	Lys	Lys	Asn	Tyr	
				210						215				220			
45	GGC	TCC	AAA	CGT	GCT	AAG	AAT	CTT	TTT	ATT	GAA	AAT	CCC	AAA	ACA	TTA	2517
	Gly	Ser	Lys	Arg	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe	Ile	Glu	Asn	Pro	Lys	Thr	Leu	
				225					230					235			
	CTA	GAA	AAT	CAA	TAT	TTA	TAGGAGATAT	T	ATG	AAT	CAA	GAT	AAC	ACT	AAA		2567
	Leu	Glu	Asn	Gln	Tyr	Leu			Met	Asn	Gln	Asp	Asn	Thr	Lys		
			240						1				5				
50	AGT	GAT	GAA	ATC	GAC	GTA	CTA	GCA	TTG	CTA	CAT	AAA	CTT	TGG	ACG	AAG	2615
	Ser	Asp	Glu	Ile	Asp	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	His	Lys	Leu	Trp	Thr	Lys	
			10				15						20				

55

EP 0 750 043 A1

	AAG CTT TTG ATT CTT TTC ACA GCT TTT TAT TTC GCT GTT TTC AGT TTC	2663
	Lys Leu 25 Leu Ile Leu Phe Thr 30 Ala Phe Tyr Phe 35 Ala Val Phe Ser Phe	
5	TTA GGT ACT TAT TTC TTT ATC CAA CCA ACA TAT ACA TCA ACA ACG CGT	2711
	Leu Gly 40 Thr Tyr Phe Phe 45 Ile Gln Pro Thr Tyr 50 Thr Ser Thr Thr Arg 55	
	ATC TAT GTT GTT AAT CAG GCA ACA GAT AAT AAG AAT CTT TCT GCT CAA	2759
	Ile Tyr Val Val Asn 60 Gln Ala Thr Asp Asn 65 Lys Asn Leu Ser Ala Gln 70	
10	GAT TTG CAA GCT GGT ACC TAT TTG GCA AAT GAC TAT AAA GAG ATT ATT	2807
	Asp Leu Gln Ala Gly Thr Tyr Leu Ala Asn Asp Tyr Lys Glu 85 Ile Ile 85	
	GCA TCA AAT GAT GTA TTA TCA GAA GTT ATT AAA GAT GAA AAA TTG AAT	2855
	Ala Ser Asn Asp Val Leu Ser 95 Glu Val Ile Lys Asp 100 Glu Lys Leu Asn 90	
15	TTG AGT GAG GCA GAA CTG TCT AAA ATG GTT TCA GTT AAT ATT CCT ACT	2903
	Leu Ser 105 Glu Ala Glu Leu 110 Lys Met Val Ser Val Asn 115 Ile Pro Thr 105	
	GAT ACT CGT CTT ATT TCA ATT TCT GTT AAT GCT AAA ACT GGT CAA GAT	2951
	Asp Thr Arg Leu Ile Ser 125 Ile Ser Val Asn 130 Lys Thr Gly Gln Asp 135	
20	GCG CAA ACA CTT GCC AAT AAG GTT CGT GAA GTT GCT TCA AAA AAA ATC	2999
	Ala Gln Thr Leu Ala Asn Lys Val Arg Glu Val Ala Ser Lys Lys 150 Ile 140	
	AAG AAG GTG ACA AAA GTT GAA GAT GTC ACA ACG CTC GAA GAA GCT AAA	3047
	Lys Lys Val Thr Lys Val Glu Asp Val Thr Thr Leu Glu Glu Ala Lys 165 155	
25	TTG CCA GAG TCA CCA TCT TCA CCA AAT ATC AAA CTT AAT GTG CTT CTT	3095
	Leu Pro Glu 170 Ser Pro Ser Ser 175 Asn Ile Lys Leu Asn Val Leu Leu 180	
	GGG GCA GTG CTT GGA GGA TTC CTT GCA GTG GTT GGT GTA TTG GTA CGT	3143
	Gly Ala Val Leu Gly Gly Phe 190 Leu Ala Val Val Gly Val Leu Val Arg 185	
	GAA ATC CTA GAT GAT CGT GTT CGC CGT CCA GAA GAT GTG GAA GAT GCC	3191
	Glu Ile Leu Asp Asp 205 Arg Val Arg Pro 210 Asp Val Glu Asp Ala 215	
35	CTT GGA ATG ACA CTT CTT GGA ATT GTC CCT GAT ACA GAT AAA ATT TAA	3239
	Leu Gly Met Thr 220 Leu Gly Ile Val 225 Pro Asp Thr Asp Lys Ile * 230	
	GGAGAAGAA ATG CCT TTA TTA AAG TTA GTT AAA TCA AAA GTA GAC TTT	3287
	Met Pro Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Lys Val Asp Phe 1 5 10	
40	GCT AAA AAG ACG GAA GAG TAT TAT AAC GCT ATT CGC ACA AAT ATT CAA	3335
	Ala Lys 15 Lys Thr Glu Glu Tyr 20 Tyr Asn Ala Ile Arg Thr Asn Ile Gln 25	
	TTT TCT GGT GCT CAG ATG AAA GTG ATT GCG ATT AGC TCT GTT GAA GCT	3383
	Phe Ser Gly Ala Gln Met 35 Lys Val Ile Ala Ile 40 Ser Ser Val Glu Ala 45	
45	GGT GAA GGA AAA TCA ATG ATA TCT GTT AAC TTG GCG ATT TCA TTT GCT	3431
	Gly Glu Gly Lys Ser 50 Met Ile Ser Val Asn Leu Ala Ile Ser Phe Ala 60	
	AGT GTT GGG CTC CGA ACA CTT CTG ATT GAT GCG GAA ACG CGT AAT TCT	3479
	Ser Val Gly Leu Arg Thr Leu Leu Ile Asp Ala Glu Thr Arg Asn Ser 65 70	
50	GTT TTG TCA GGT ACA TTT AAA TCA AAT GAG CCT TAT AAA GGT CTT TCA	3527
	Val Leu Ser Gly Thr Phe Lys 85 Ser Asn Glu Pro Tyr 90 Lys Gly Leu Ser 80	
	AAT TTC CTT TCA GGA AAT GCC GAT CTA AAT GAA ACG ATT TGC CAA ACT	3575

55

EP 0 750 043 A1

	Asn	Phe	Leu	Ser	Gly	Asn	Ala	Asp	Leu	Asn	Glu	Thr	Ile	Cys	Gln	Thr	
		95					100					105					
5	GAT	ATT	TCT	GGT	TTA	GAT	GTT	ATT	GCA	TCT	GGT	CCT	GTT	CCA	CCT	AAT	3623
	Asp	Ile	Ser	Gly	Leu	Asp	Val	Ile	Ala	Ser	Gly	Pro	Val	Pro	Pro	Asn	
	110					115					120					125	
	CCA	ACA	AGT	CTT	TTG	CAA	AAT	GAT	AAT	TTT	AGA	CAT	TTG	ATG	GAA	GTT	3671
	Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	Gln	Asn	Asp	Asn	Phe	Arg	His	Leu	Met	Glu	Val	
					130					135					140		
10	GCT	CGT	AGT	TGT	TAT	GAT	TAT	GTC	ATC	ATC	GAT	ACA	CCA	CCA	GTT	GGT	3719
	Ala	Arg	Ser	Cys	Tyr	Asp	Tyr	Val	Ile	Ile	Asp	Thr	Pro	Pro	Val	Gly	
				145					150					155			
	CTG	GTT	ATT	GAT	GCA	GTT	ATT	ATT	GCC	CAT	CAG	GCT	GAT	GCC	AGT	CTT	3767
	Leu	Val	Ile	Asp	Ala	Val	Ile	Ile	Ala	His	Gln	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	
			160					165					170				
15	TTG	GTT	ACA	GAA	GCT	GGG	AAA	ATT	AAA	CGT	CGT	TTC	GTA	ACT	AAG	GCC	3815
	Leu	Val	Thr	Glu	Ala	Gly	Lys	Ile	Lys	Arg	Arg	Phe	Val	Thr	Lys	Ala	
							180					185					
	GTT	GAA	CAA	TTG	GTA	GAA	AGT	GGT	TCT	CAG	TTC	TTA	GGG	GTC	GTC	CTT	3863
	Val	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ser	Gln	Phe	Leu	Gly	Val	Val	Leu	
	190					195					200					205	
20	AAT	AAA	GTT	GAC	ATG	ACA	GTT	GAT	AAA	TAT	GGA	TTT	TAT	GGT	TCT	TAC	3911
	Asn	Lys	Val	Asp	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Ser	Tyr	
					210					215					220		
	GGA	TCA	TAT	GGC	GAG	TAT	GGA	AAA	AAA	TCT	GAC	CAA	AAA	GAA	GGT	CAT	3959
	Gly	Ser	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys	Ser	Asp	Gln	Lys	Glu	Gly	His	
				225					230					235			
25	TCA	AGA	GCA	CAT	CGT	CGT	AGA	AAA	GTC	GGT	TGG	AAT	TAACGCGTTA				4005
	Ser	Arg	Ala	His	Arg	Arg	Arg	Lys	Val	Gly	Trp	Asn					
				240				245									
	GTGTGTTT	TA	AGATGTCGTT	GGGAACGACA	AGTGGAGGGA	ATGAG	ATG	TCA	CAA								4059
								Met	Ser	Gln							
								1									
30	GCT	AAA	GAG	GAA	ATT	TCA	GAT	GTT	ATG	ACT	TAT	TCA	GAG	CTA	ACA	AGT	4107
	Ala	Lys	Glu	Glu	Ile	Ser	Asp	Val	Met	Thr	Tyr	Ser	Glu	Leu	Thr	Ser	
			5				10					15					
	CAT	AAG	CCC	AAA	ATT	ATT	TAT	AGC	TTG	ATT	AAG	CGG	ATT	GGT	GAT	ATT	4155
	His	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Tyr	Ser	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	
35					25					30					35		
	TTG	GTT	AGT	TCT	ATT	GGT	TTA	ATT	ATT	TTG	ATA	CCG	CTA	TTT	TTG	ATA	4203
	Leu	Val	Ser	Ser	Ile	Gly	Leu	Ile	Ile	Leu	Ile	Pro	Leu	Phe	Leu	Ile	
					40					45					50		
	GTT	GCT	TTG	ATC	ATG	AAA	TGC	TCT	GAA	CCA	ACA	GCA	CCT	ATA	TTT	TTC	4251
	Val	Ala	Leu	Ile	Met	Lys	Cys	Ser	Glu	Pro	Thr	Ala	Pro	Ile	Phe	Phe	
40				55					60					65			
	TCA	CAT	ATT	AGA	AAT	GGT	AAA	AAT	GGC	AAA	AAG	TTC	AAA	ATG	TAT	AAA	4299
	Ser	His	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Asn	Gly	Lys	Lys	Phe	Lys	Met	Tyr	Lys	
				70				75					80				
	TTT	AGA	ACC	ATG	TGT	CAG	GAC	GCA	GAA	TCG	ATT	TTG	ATG	AAA	GAT	ACG	4347
45	Phe	Arg	Thr	Met	Cys	Gln	Asp	Ala	Glu	Ser	Ile	Leu	Met	Lys	Asp	Thr	
				85			90					95					
	GAA	CIT	TTT	GCA	AAA	TTT	AAG	GCA	AAT	GGT	TAT	AAA	CTT	GAA	ACG	CAT	4395
	Glu	Leu	Phe	Ala	Lys	Phe	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Leu	Glu	Thr	His	
						105					110					115	
	GAA	GAT	CCT	AGA	ATT	ACA	AAA	ATC	GGT	GGC	ATA	TTA	AGG	AAA	ACA	AGT	4443
	Glu	Asp	Pro	Arg	Ile	Thr	Lys	Ile	Gly	Gly	Ile	Leu	Arg	Lys	Thr	Ser	
50					120					125					130		
	ATT	GAT	GAA	TTG	CCA	CAA	CTG	ATT	AAT	GTT	TTT	TTA	GGA	CAA	ATG	TCA	4491
	Ile	Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu	Ile	Asn	Val	Phe	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	
55																	

EP 0 750 043 A1

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

EP 0 750 043 A1

	CTT TTT CAA TCA TTT ATT AAG CAA AAT GGA CTA GAG GGA AAT ATC CAT	5530
	Leu Phe Gln Ser Phe Ile Lys Gln Asn Gly Leu Glu Gly Asn Ile His	
	200 205 210	
5	TTG CTT GGC GAG CGT CCT GAT AGT GAA ATA GTT GTG ACA GCC TAT GAC	5578
	Leu Leu Gly Glu Arg Pro Asp Ser Glu Ile Val Val Thr Ala Tyr Asp	
	215 220 225	
	ATC TTC TTG ACG ACT TCC CAA TAT GAA GGT TTA CCT TAT GCA CCA ATT	5626
	Ile Phe Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Glu Gly Leu Pro Tyr Ala Pro Ile	
	230 235 240	
10	GAA GCG ATG CGA GCT GGT GTC CCG ATT CTT GCG ACA AAA GTT GTT GGC	5674
	Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Pro Ile Leu Ala Thr Lys Val Val Gly	
	245 250 255	
	AAT AGT GAG CTT GTG ATA GAG GGC AAA AAT GGT TAT TTG ATT GAC TTA	5722
	Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu Gly Lys Asn Gly Tyr Leu Ile Asp Leu	
	260 265 270 275	
15	GAG TGG TCA AAA TCT GTC GAA GAA AAA TTA TAT AAG GCA GCG AAA ATA	5770
	Glu Trp Ser Lys Ser Val Glu Glu Lys Leu Tyr Lys Ala Ala Lys Ile	
	280 285 290	
	GAT GCA CAA ATG ATT AAA GCA GAT TTT AGG CAA AGG TTT GCG ATT GAT	5818
	Asp Ala Gln Met Ile Lys Ala Asp Phe Arg Gln Arg Phe Ala Ile Asp	
	295 300 305	
20	CAG ATA TTA AAG CAA ATT GAA ACA ATT TAT TTA GCT TGAATGAAGA	5864
	Gln Ile Leu Lys Gln Ile Glu Thr Ile Tyr Leu Ala	
	310 315	
25	ATGAGGAGGC ATAAATGCTG ATTTTGAAAT TAAAATTTCA TCTTAATTGG TACACAAACG	5924
	AAAACCATTA TTACACGTGA GTATTCGAAG ACCTGGAAC GAGGCGATGA GCCGTATTAT	5984
	CCAGTGAACA ATGATCGTAA CAACAACTC TATACTGCCT ATAAGCGTCT TGCCGAGCAA	6044
	CAAGAGAATG TCATTTTCGG TGGACGTCTA GGTCCTACC GTTACTACGA TATGCACCAG	6104
30	GTAATTGGAG CTGCCTTGCA GTGTGTCAGA AATGAAGTGA AGTAAATCTT GATGAAGTTG	6164
	AATAACTTTA AGTAATTTTA TACTTAATCC AATTGATGAA AATATTTTGG TATCGATTTA	6224
	TCTTCTGTAA GAAGAGTCCT AATCGTTTAA AAAATGTACA ATTGAGTTTT TATATTTTAA	6284
	AATAAAGTTA CTTTAAAGTC GTGTTATAGA ATATACATGA ATAGGTGTAT TAGAAAATTT	6344
35	ATTAATCTAA TCCTCGAAAA TAACTGACTG TAAGGAATCA AGTTGTGGAG TGTAAGTTGT	6404
	CAAATGGAGA GGAAAATAAT ATG AAA AAA ATT TCA ATT TTA CAC TTT TCC	6454
	Met Lys Lys Ile Ser Ile Leu His Phe Ser	
	1 5 10	
40	CAA GTA TCA GGC GGG GGA GTT GAA AAG TAC ATA AAA TTA TTT TTA AAG	6502
	Gln Val Ser Gly Gly Gly Val Glu Lys Tyr Ile Lys Leu Phe Leu Lys	
	15 20 25	
	TAT TCT GAT GTG ACA AAA TTT AAT AAT TAT TTA GTT GCA CCT AAT CTT	6550
	Tyr Ser Asp Val Thr Lys Phe Asn Asn Tyr Leu Val Ala Pro Asn Leu	
	30 35 40	
45	GAA AAT TAT GAC GAA TTT AAT GGA TAT TTA AAG ATG TCT GTC AAT TTT	6598
	Glu Asn Tyr Asp Glu Phe Asn Gly Tyr Leu Lys Met Ser Val Asn Phe	
	45 50 55	
	AAT ATG GAA CAA ACT TTT TCT CCG CTA AAA ATA TTC AAA AAT GTC TTT	6646
	Asn Met Glu Gln Thr Phe Ser Pro Leu Lys Ile Phe Lys Asn Val Phe	
	60 65 70	
50	TTT ATT CGT AGT GTA CTC AAA AAA ATA AAC CCA GAT ATA GTA TAC CTA	6694
	Phe Ile Arg Ser Val Leu Lys Lys Ile Asn Pro Asp Ile Val Tyr Leu	
	75 80 85 90	
55		

EP 0 750 043 A1

	CAT AGT ACA TTT GCA GGT GTC GTA GGT CGT ATT GCT TCA ATA GGT TTG His Ser Thr Phe Ala Gly Val Val Gly Arg Ile Ala Ser Ile Gly Leu 95 100 105	6742
5	CCA ACA AAA GTA GTA TAC AAT CCT CAC GGA TGG TCC TTC AAA ATG GAC Pro Thr Lys Val Val Tyr Asn Pro His Gly Trp Ser Phe Lys Met Asp 110 115 120	6790
	AAC AGC TAT TTG AAA AAG CTT ATT TTT AAA TTA ATC GAA TTT TCT TTA Asn Ser Tyr Leu Lys Lys Leu Ile Phe Lys Leu Ile Glu Phe Ser Leu 125 130 135	6838
10	TCT TTT TTA ACT GAT AAG TTT ATT TTA ATT TCG GAA TCT GAG TAT ATT Ser Phe Leu Thr Asp Lys Phe Ile Leu Ile Ser Glu Ser Glu Tyr Ile 140 145 150	6886
	TTG GCT AAC CAT ATT TCA TTT AAT AAA AGC AAG TTT TCA CTA ATT AAT Leu Ala Asn His Ile Ser Phe Asn Lys Ser Phe Ser Leu Ile Asn 155 160 165 170	6934
15	AAT GGT GTT GAA GTG ATT ACA GGG GAT TCA AGA AAT GAG ATA GAA GAG Asn Gly Val Glu Ile Thr Gly Asp Ser Arg Asn Glu Ile Glu Glu 175 180 185	6982
	ATA TTT CCA AAT GAG GAT TTT ATA ATT GGC ATG GTT GGC AGA CTA AGC Ile Phe Pro Asn Glu Asp Phe Ile Ile Gly Met Val Gly Arg Leu Ser 190 195 200	7030
20	CCA CCC AAA GAG TTT TTC TTT TTT ATT GAT TTT GCA AAA AAA ATA TTA Pro Pro Lys Glu Phe Phe Phe Phe Ile Asp Phe Ala Lys Lys Ile Leu 205 210 215	7078
	CAA ATT CGA AAC GAT ACC AAT TTT ATT ATC GTG GGT GAT GGA GAG TTA Gln Ile Arg Asn Asp Thr Asn Phe Ile Ile Val Gly Asp Gly Glu Leu 220 225 230	7126
25	CGA AGT GAA ATA GAA AGA ATG ATA CTA GAT AAT GGG TTA GGA GAT AAA Arg Ser Glu Ile Glu Arg Met Ile Leu Asp Asn Gly Leu Gly Asp Lys 235 240 245 250	7174
	ATC TAT ATT ACT GGG TGG GTT GAT AAT CCG AGA AAC TAT ATA GAG AAG Ile Tyr Ile Thr Gly Trp Val Asp Asn Pro Arg Asn Tyr Ile Glu Lys 255 260 265	7222
30	TTT GAT CAA GCT ATT CTG TTT TCT AGA TGG GAG GGT CTT AGC CTA ACG Phe Asp Gln Ala Ile Leu Phe Ser Arg Trp Glu Gly Leu Ser Leu Thr 270 275 280	7270
	ATT GCG GAA TAT ATG TCT CAG AAG AAA ACA ATT TTA GCA ACA AAT ATT Ile Ala Glu Tyr Met Ser Gln Lys Lys Thr Ile Leu Ala Thr Asn Ile 285 290 295	7318
35	GGT GGC ATT AAT GAT TTA ATC ACT GAT GGT GAA ACA GGA ATG CTG ATT Gly Gly Ile Asn Asp Leu Ile Thr Asp Gly Glu Thr Gly Met Leu Ile 300 305 310	7366
	GAA GTT GGA GAC TTG AAT TCA GCA GTA TCT AAA TCT TTC GAG CTA AGA Glu Val Gly Asp Leu Asn Ser Ala Val Ser Lys Ser Phe Glu Leu Arg 315 320 325 330	7414
40	AAT AAT AAA GAG GTT TCG AAT CAA TTA GCG AAT AAC GCT TAT AAT AAA Asn Asn Lys Glu Val Ser Asn Gln Leu Ala Asn Asn Ala Tyr Asn Lys 335 340 345	7462
	GTT GTT GAA CAG TTT TCG ATT GAA AAA CAG ATG GCT GAG ATA GAA AGT Val Val Glu Gln Phe Ser Ile Glu Lys Gln Met Ala Glu Ile Glu Ser 350 355 360	7510
45	TTA TTT ATA GAG ATG TGT AAC AAT GAG AAA TAGAGACTTA AAGAAAATAC Leu Phe Ile Glu Met Cys Asn Asn Glu Lys 365 370	7560
	AGGTTATTTG ATTGACTTAG AGTGGTCAAA ATCTGTGCGAA GAAAAATTAT ATAAGGCAGC	7620
50	GAAAATGGAT GCACAAATGA TTAAGCAGA TTTTAGGCAA AGGTTTGCGA TTGATCAGAT	7680
	GTAAAGCAA ATTAACAACAA TTTATTTAGC TTGAATGAAG AAAGAGGAGG CATAA ATG	7738

55

EP 0 750 043 A1

Met
1

5	CTG Leu	ATT Ile	TTG Leu	AAA Lys 5	TTA Leu	AAA Lys	TTT Phe	CAT His	CTT Leu 10	AAA Lys	TCG Ser	TTA Leu	TTT Phe	CTT Leu 15	AAA Lys	TGG Trp	7786
	ATT Ile	TAT Tyr	CGA Arg 20	TTA Leu	CTT Leu	TAT Tyr	CTA Leu	AAA Lys 25	AAG Lys	TTT Phe	CAG Gln	TTT Phe	GGT Gly 30	GCA Ala	CGC Arg	TTG Leu	7834
10	ACG Thr	TTT Phe 35	CGA Arg	GAT Asp	GGG Gly	TTT Phe	CAT His 40	TTG Leu	TTA Leu	ATT Ile	GAA Glu	AAA Lys 45	TCT Ser	GGG Gly	AAA Lys	GTT Val	7882
	ATC Ile 50	ATC Ile	GGG Gly	AAT Asn	CAT His	GTT Val 55	TTT Phe	TTT Phe	AAT Asn	AAC Asn	TTT Phe 60	TGT Cys	TCA Ser	ATT Ile	AAT Asn	GCC Ala 65	7930
15	ATG Met	TTA Leu	TCA Ser	GTA Val	ACG Thr 70	ATT Ile	GGT Gly	GAT Asp	GAC Asp	TGT Cys 75	ATT Ile	TTT Phe	GGT Gly	GAA Glu	AAC Asn 80	GTT Val	7978
	AAA Lys	ATT Ile	TAT Tyr	GAT Asp 85	CAC His	AAT Asn	CAT His	TGT Cys	TAT Tyr 90	CAA Gln	AAT Asn	AAA Lys	AGT Ser	CAA Gln 95	CCT Pro	ATT Ile	8026
20	TCA Ser	AAA Lys	CAA Gln 100	GGT Gly	TTT Phe	TCA Ser	ACT Thr	GCT Ala 105	ATC Ile	CAG Gln	ATT Ile	GGT Gly 110	CGT Arg	AAC Asn	TGT Cys	8074	
	TGG Trp	ATA Ile 115	GGT Gly	AGT Ser	CAA Gln	GTG Val	ACG Thr 120	ATT Ile	TTA Leu	AAA Lys	GGT Gly	GTA Val 125	ACC Thr	ATA Ile	GGT Gly	GAT Asp	8122
25	AAT Asn 130	AGT Ser	ATC Ile	ATT Ile	GGT Gly	GCT Ala 135	GGT Gly	GTG Val	GTA Val	GTT Val	TAT Tyr 140	CAA Gln	GAT Asp	GTG Val	CCA Pro	GAA Glu 145	8170
	AAT Asn	TCG Ser	ATT Ile	GTT Val 150	TTA Leu	TCT Ser	AAT Asn	GGA Gly	GAA Glu	ATT Ile 155	AGA Arg	AAG Lys	CGT Arg	GGC Gly		8212	
30	TAATTA Met 1	AAA Tyr	ATG Leu	TAT Leu	CTT Leu	AAA Lys	AGT Ser 5	CTA Leu	ATC Ile	TCT Ser	ATT Ile	GTT Val 10	ATT Ile	CCA Pro	GTA Val	TAT Tyr	8262
	AAT Asn 15	GTA Val	GAG Glu	AAA Lys	TAT Tyr	TTA Leu 20	GAA Glu	AAA Lys	TGT Cys	TTG Leu	CAA Gln 25	TCT Ser	GTT Val	CAA Gln	AAT Asn	CAG Gln 30	8310
35	ACT Thr	TAC Tyr	AAT Asn	AAT Asn	TTT Phe 35	GAA Glu	GTG Val	ATT Ile	TTA Leu	GTG Val 40	AAT Asn	GAT Asp	GGC Gly	TCA Ser	ACC Thr 45	GAT Asp	8358
	TCA Ser	TCA Ser	CTT Leu	TCA Ser 50	ATA Ile	TGC Cys	GAA Glu	AAA Lys	TTT Phe 55	GTT Val	AAT Asn	CAG Gln	GAT Asp 60	AAA Lys	AGA Arg	TTT Phe	8406
40	TCT Ser	GTT Val	TTT Phe 65	TCT Ser	AAA Lys	GAA Glu	AAT Asn	GGT Gly 70	GGT Gly	ATG Met	TCA Ser	TCT Ser	GCA Ala 75	CGA Arg	AAT Asn	TTT Phe	8454
	GGA Gly	ATT Ile 80	AAA Lys	AAG Lys	GCT Ala	AAA Lys	GGA Gly 85	TCG Ser	TTT Phe	ATC Ile	ACA Thr	TTT Phe 90	GTA Val	GAT Asp	AGT Ser	GAT Asp	8502
45	GAC Asp 95	TAC Tyr	ATA Ile	GTA Val	AAA Lys	GAT Asp 100	TAT Tyr	CTT Leu	TCT Ser	CAT His	TTG Val 105	GTA Val	GCT Ala	GGG Gly	ATA Ile	AAA Lys 110	8550
	AGT Ser	GAG Glu	ACC Thr	TCT Ser	ATA Ile 115	GTT Val	TGT Cys	TCA Ser	AAG Lys	TTT Phe 120	TTT Phe	CTT Leu	GTA Val	GAT Asp	GAA Glu 125	AAA Lys	8598
50	GGA Gly	AGT Ser	TTA Leu	TTG Leu	ACT Thr	AAA Lys	AAA Lys	GAG Glu	GCA Ala	CCT Pro	AAA Lys	AAG Lys	AAA Lys	TCA Ser	GAA Glu	GTC Val	8646

55

EP 0 750 043 A1

	130	135	140	
5	GTT TCA ATT GAG GAA AGT ATT AAA ATT CTT CTG TTG CAA CAA AAT GGC Val Ser Ile Glu Glu Ser Ile Lys Ile Leu Leu Leu Gln Asn Gly 145 150 155			8694
	TAT GAT CTC GCT GTC TGG GGA AAA TTA TAC CCC GTT TCT TTC TTT GAA Tyr Asp Leu Ala Val Trp Gly Lys Leu Tyr Pro Val Ser Phe Phe Glu 160 165 170			8742
10	ACA ATT TCT TTC CCA GAA GGA AAA CTT TAC GAA GAT ATG GGA ACA ACT Thr Ile Ser Phe Pro Glu Gly Lys Leu Tyr Glu Asp Met Gly Thr Thr 175 180 185 190			8790
	TAC AAA TTA CTA AAA TTG GCA AGT GAA GTG GTC TTC TTG GAT GCG TAT Tyr Lys Leu Leu Lys Leu Ala Ser Glu Val Val Phe Leu Asp Ala Tyr 195 200 205			8838
15	GAT TAT GCC TAC GTA CAG CGA CCT AAT AGT ATC ATG AAT AGT TCT TTT Asp Tyr Ala Tyr Val Gln Arg Pro Asn Ser Ile Met Asn Ser Ser Phe 210 215 220			8886
	AAT TTG AAA AAG TTG GAT ATA ATA GAA ATG GTT CAT GAA ATG GAA AAC Asn Leu Lys Lys Leu Asp Ile Ile Glu Met Val His Glu Met Glu Asn 225 230 235			8934
20	GAT ATA TTA GCA CAG TTT CCA AAT TTA GCA TTA TAT GTT AAG AAT CGA Asp Ile Leu Ala Gln Phe Pro Asn Leu Ala Leu Tyr Val Lys Asn Arg 240 245 250			8982
	GCA TTT GCC GCG GAA GTG AAA ATC TTT TTA GAG ATT CCA AAA GAA AAA Ala Phe Ala Ala Glu Val Lys Ile Phe Leu Glu Ile Pro Lys Glu Lys 255 260 265 270			9030
25	GAA TTT GAG CAA GCG CAA AAG CAA CTT TGG CAT GAT ATC AAA AAG AAT Glu Phe Glu Gln Ala Gln Lys Gln Leu Trp His Asp Ile Lys Lys Asn 275 280 285			9078
	AGA AAA GCA CCA TTT ATG ACA AAA GGT GCT AGA TTG AAG AAT AGG CTC Arg Lys Ala Pro Phe Met Thr Lys Gly Ala Arg Leu Lys Asn Arg Leu 290 295 300			9126
30	GGA GCT AGT CTG TCG TTT TTA GGT AAA TCT TTA TTT TTG ACT ATT GGG Gly Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gly Lys Ser Leu Phe Leu Thr Ile Gly 305 310 315			9174
	AAG CAG TTA GTA GAT AGA TAATGATATT GAAAGCGATA CGATACAATC Lys Gln Leu Val Asp Arg 320			9222
35	GTAAACTTCT TTTGGTGTG ACTAGGAGTT AGCTTGAAAT TTGAATATAA AGGAAGCAAC			9282
	AC ATG GTA ATT TAT TTT TTA CTT TTC CCG ATG ATC GCA ATG ATT TAT Met Val Ile Tyr Phe Leu Leu Phe Pro Met Ile Ala Met Ile Tyr 1 5 10 15			9329
40	TTA ATG ACA TTG CTC TTA CGG CAA AAA GCA CAA ATC CAA AAA ACG ATT Leu Met Thr Leu Leu Leu Arg Gln Lys Ala Gln Ile Gln Lys Thr Ile 20 25 30			9377
	TTT TGT GTT CTT ACG TTT GGT ACA CTA GGC TTT ATT TCA GCA AGT CGT Phe Cys Val Leu Thr Phe Gly Thr Leu Gly Phe Ile Ser Ala Ser Arg 35 40 45			9425
45	GCA TCA AGT GTT GGG ACG GAC GTT ACT TTA TAC GAA AAT ATT TTT AAA Ala Ser Ser Val Gly Thr Asp Val Thr Leu Tyr Glu Asn Ile Phe Lys 50 55 60			9473
	TCT ATA AAT TAC GGG ATA AGT GCT GAG AAT AAT TGG GGA TAC GTC ATC Ser Ile Asn Tyr Gly Ile Ser Ala Glu Asn Asn Trp Gly Tyr Val Ile 65 70 75			9521
50	TAT AAC AAG CTG ATT GGT AGT GTA TTT GGC TAT ACA GGA CAT GAA ATC Tyr Asn Lys Leu Ile Gly Ser Val Phe Gly Tyr Thr Gly His Glu Ile 80 85 90 95			9569
55				

EP 0 750 043 A1

	ACG GCC GCT AAT TCA GTT TTG ATT ACA ATA CTT ATT GGT ATT TTT ATT	9617
	Thr Ala Ala Asn Val Leu Ile Thr Ile Leu Ile Gly Ile Phe Ile	
	100 105 110	
5	TGG AAA GTA GCG GAA CAT TAT TTT GTT GCG ACG TTT TTA TAC ATT AGC	9665
	Trp Lys Val Ala Glu His Tyr Phe Val Ala Thr Phe Leu Tyr Ile Ser	
	115 120 125	
	TTG TTT TAT TAT GCT ACA AGT TTT AAT ATT TCA AGA CAA TTT ATT GCC	9713
	Leu Phe Tyr Tyr Ala Thr Ser Phe Asn Ile Ser Arg Gln Phe Ile Ala	
	130 135 140	
10	ATG GGG CTT GTA TTG GTA GCA ATT TCT TTT GCT TTA GAT AAA AAG GTT	9761
	Met Gly Leu Val Leu Val Ala Ile Ser Phe Ala Leu Asp Lys Lys Val	
	145 150 155	
	ATG CCT TGG TTT ATC TTG ACA GTT TTG GCT ACC TTA TTT CAT GCG ACA	9809
	Met Pro Trp Phe Ile Leu Thr Val Leu Ala Thr Leu Phe His Ala Thr	
	160 165 170 175	
15	GCA ATC GTT GCT TTT CCT GTC TAT TGG CTT ACA AAA GTA CAT TGG GAT	9857
	Ala Ile Val Ala Phe Pro Val Tyr Trp Leu Thr Lys Val His Trp Asp	
	180 185 190	
	GTG AAA AAG ACA TTA AGT ATT TTT CCA ATC ACG ATT TTT GCA AGT TTT	9905
	Val Lys Lys Thr Ser Ile Phe Pro Ile Thr Ile Phe Ala Ser Phe	
	195 200 205	
20	ATT TTT GAT GCT ATT TTA AAC ATT TTT GTA CGT TTT TTC CCA CAT TAT	9953
	Ile Phe Asp Ala Ile Leu Asn Ile Phe Val Arg Phe Phe Pro His Tyr	
	210 215 220	
	GAG ATG TAT ATC ACT GGA ACA CAA TTT AAT ATT TCA GAT CAG GGG CAG	10001
	Glu Met Tyr Ile Thr Gly Thr Gln Phe Asn Ile Ser Asp Gln Gly Gln	
	225 230 235	
25	GGA CGT GTG GTT TTG GTC AAA ATA TTT ATC TTG CTC ATT TTG TTT ACT	10049
	Gly Arg Val Val Leu Val Lys Ile Phe Ile Leu Leu Ile Leu Phe Thr	
	240 245 250 255	
	TTA TTC TTG TTT TAT AAA AAA AGC TAT GCT TTG ATT TCT GAA TGT CAT	10097
	Leu Phe Leu Phe Tyr Lys Lys Ser Tyr Ala Leu Ile Ser Glu Cys His	
	260 265 270	
	CAA AGT TTG ATA GCT TTG ACA ACC GTT GGA TTA AGT ATC GGT ATT GTA	10145
	Gln Ser Leu Ile Ala Leu Thr Thr Val Gly Leu Ser Ile Gly Ile Val	
	275 280 285	
35	TTT TAT AAT AAT ATT TTA CTC AAT AGA ATA GAA ATG TTT TAT TCA ATT	10193
	Phe Tyr Asn Asn Ile Leu Leu Asn Arg Ile Glu Met Phe Tyr Ser Ile	
	290 295 300	
	TTA AGC ATC GTA TTT ATT CCA ATT GCT ATA GAT TAC ATT AGT TTG AAA	10241
	Leu Ser Ile Val Phe Ile Pro Ile Ala Ile Asp Tyr Ile Ser Leu Lys	
	305 310 315	
40	TTT AAA CAA AAA GAT GCT GTG CGA CTA ATG CTG ACG ATA GGT ATT TTG	10289
	Phe Lys Gln Lys Asp Ala Val Arg Leu Met Leu Thr Ile Gly Ile Leu	
	320 325 330 335	
	TTA ATT ACA CTT GTG CCT TAC TAT ATA CAG GTT AGC GGT AAT TAT TCA	10337
	Leu Ile Thr Leu Val Pro Tyr Tyr Ile Gln Val Ser Gly Asn Tyr Ser	
	340 345 350	
45	GGA ATA TTG CCT TAT GTT ATT CAA CAA TAAAAAATAA AGTTTAGAGA	10384
	Gly Ile Leu Pro Tyr Val Ile Gln Gln	
	355 360	
	GGAAATA ATG GAG GAT AGA AAG AAA CAA GTA ATT TTG ATA CTA TCC CAC	10433
	Met Glu Asp Arg Lys Lys Gln Val Ile Leu Ile Leu Ser His	
	1 5 10	
50	AGA AAT ACT CTC GCT CTA AAA TCA ACA ATA GAG CTT TTG GAT TCT CAA	10481
	Arg Asn Thr Leu Ala Leu Lys Ser Thr Ile Glu Leu Leu Asp Ser Gln	
	15 20 25 30	

55

EP 0 750 043 A1

	TAC	TTT	GAT	TTC	TTT	CTT	CAT	ATA	GAT	AAA	AAA	AGT	AGA	ATT	CAA	GAT	10529
	Tyr	Phe	Asp	Phe	Phe	Leu	His	Ile	Asp	Lys	Lys	Ser	Arg	Ile	Gln	Asp	
					35					40					45		
5	TTT	TTT	TAT	TTA	AAA	AAA	ATT	ACA	AAA	TTC	TCC	ACT	ATT	CAT	TTT	TCA	10577
	Phe	Phe	Tyr	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys	Phe	Ser	Thr	Ile	His	Phe	Ser	
				50					55					60			
	GAA	AGA	AAA	AAT	GTA	CAT	TGG	GGA	GGT	TTT	TCT	ATG	GTA	GAA	GCA	ATG	10625
	Glu	Arg	Lys	Asn	Val	His	Trp	Gly	Gly	Phe	Ser	Met	Val	Glu	Ala	Met	
			65					70					75				
10	TTT	GCG	CTA	TTA	GAA	TGT	GCA	CGT	GAT	ACA	GGA	GAA	TAT	TCT	TAT	TTT	10673
	Phe	Ala	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Arg	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Phe	
		80					85					90					
	CAT	TTT	TTA	TCT	GGA	GAT	GAT	ATG	CCA	ATC	AAA	GAT	AAT	GAA	ATA	GTA	10721
	His	Phe	Leu	Ser	Gly	Asp	Met	Pro	Ile	Lys	Asp	Asn	Glu	Ile	Val		
	95				100					105					110		
15	TTT	AAT	TTT	TTT	GAA	AAT	AGT	TAT	CCT	AAA	AAT	TTT	ATT	GAT	ATT	CTA	10769
	Phe	Asn	Phe	Phe	Glu	Asn	Ser	Tyr	Pro	Lys	Asn	Phe	Ile	Asp	Ile	Leu	
					115					120					125		
	GAT	TTT	GAA	AAT	GTC	AAT	AAA	AAT	TCA	TAT	TTC	TAC	GAA	CCC	CCT	GAG	10817
	Asp	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	
				130					135					140			
20	ATG	ATA	GAG	GAG	AGA	GTG	AAG	TAC	TAC	TAT	CCT	CAT	ATG	GAT	ATT	CTA	10865
	Met	Ile	Glu	Glu	Arg	Val	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	His	Met	Asp	Ile	Leu	
			145					150					155				
	AAC	AGA	AAA	GGA	ACA	AAT	TTC	ATA	GGG	AAA	AAA	CTA	ATT	TAT	CTA	CAA	10913
	Asn	Arg	Lys	Gly	Thr	Asn	Phe	Ile	Gly	Lys	Lys	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gln	
		160					165					170					
25	AAA	TTG	TTG	AAA	GTT	AAT	CGC	TTG	AAA	AAT	AGA	GAG	ATA	GAA	ATT	TTC	10961
	Lys	Leu	Leu	Lys	Val	Asn	Arg	Leu	Lys	Asn	Arg	Glu	Ile	Glu	Ile	Phe	
		175				180					185					190	
	AAG	GGT	CAT	CAA	TGG	TGT	AGT	TTG	ACA	AAT	CAA	TTT	GTA	GAT	ATT	TTA	11009
	Lys	Gly	His	Gln	Trp	Cys	Ser	Leu	Thr	Asn	Gln	Phe	Val	Asp	Ile	Leu	
				195						200					205		
30	TTG	GAT	AAA	GAG	GAA	AGA	AGA	GTA	GGT	AAG	TCT	TAT	TTT	TCA	TCT	AGT	11057
	Leu	Asp	Lys	Glu	Glu	Arg	Arg	Val	Gly	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Ser	Ser	
				210				215						220			
	TTA	ATA	CCA	GAT	GAA	TGT	TAT	TTT	CAA	ACG	TTT	GCT	ATG	ATA	AAA	AAA	11105
	Leu	Ile	Pro	Asp	Glu	Cys	Tyr	Phe	Gln	Thr	Phe	Ala	Met	Ile	Lys	Lys	
			225					230					235				
	GTT	GAA	ATT	TAT	CAA	CAG	AAA	AAT	ATG	TCA	GCA	CGC	TTA	ATT	GAT	TGG	11153
	Val	Glu	Ile	Tyr	Gln	Gln	Lys	Asn	Met	Ser	Ala	Arg	Leu	Ile	Asp	Trp	
		240					245					250					
	ACA	AGA	GGG	AAA	CCA	TAT	ATT	TGG	CGA	CAG	GAT	GAT	TTT	TTT	GAA	ATT	11201
	Thr	Arg	Gly	Lys	Pro	Tyr	Ile	Trp	Arg	Gln	Asp	Asp	Phe	Phe	Glu	Ile	
		255				260					265					270	
	ATG	AAT	GAT	AAA	GAT	TCA	ATG	TTT	TCT	AGG	AAG	TTT	GAT	GAA	AAT	GTA	11249
	Met	Asn	Asp	Lys	Asp	Ser	Met	Phe	Ser	Arg	Lys	Phe	Asp	Glu	Asn	Val	
					275					280					285		
	GAT	CGT	AAA	ATA	ATT	GAA	GAA	ATT	TAT	ATA	AAA	ATA	AGA	GGA	AGA	AGT	11297
	Asp	Arg	Lys	Ile	Ile	Glu	Glu	Ile	Tyr	Ile	Lys	Ile	Arg	Gly	Arg	Ser	
				290				295						300			
	ACT	GAT	GAA	GCA	AAT	AAA	ATC	AAA	GAT	AAG	AGA	TTT	ACA	AAA			11339
	Thr	Asp	Glu	Ala	Asn	Lys	Ile	Lys	Asp	Lys	Arg	Phe	Thr	Lys			
			305					310					315				
50	TAATTTTACC	TATGTTTTTG	GAAAGAAAAC	TTTTCTTGGA	AGGGGAGAAG	CGATTATCAT											11399
	AGATGAACCT	GAGCATGGAA	ATTTGGGAGA	TCAAGCAATT	GCTTTTGAG	AAAATCAATT											11459
	TTTAGTAAAT	CATGTATCAG	TACGAGATGT	AGAATCATCTT	ATAGAAAGCA	AAACTATTTTC											11519

55

EP 0 750 043 A1

	AGAAATAAAA TCTATAAAAA AAAATATTGG AAAAAAAGAA TTAGTTTTTT TTCATGGGGG	11579
	AGGAAATTC GGGACACTTT ATCTAAAGTA TGAGCGCATT AGAAGATTGG CAGTATCAAA	11639
5	GCTTCCCTTT AATAAAATGA TTCTATTTCC TCAGTCAATT TCATTTGAAG ATAGTAGGTT	11699
	TGGTCAGAAG CAGCTGAATA AAAGTAAAAA AATATACAGT CAAAATACAA ATTTTATTTT	11759
	GACTGCAAGA GAACCAAAAT CTTATGGTTT AATGAAGAAA TGTTTTCCAT ATAACAAAGT	11819
	AATCTTGACA CCGGATATCG TGCTCTCATT TAAATTTGAA GTCACCATTT CTGATACGCA	11879
10	TATTGGGAAA GAAAAGGATA GTGTTATAAC TTATGAAAAT CGTCAACACT ATCTTGAGAT	11939
	AAAGTGGGAT GAAATTGCGC AGCATGAGGT CGCCTTAACT GATAGATTAC ATGGTATGAT	11999
	TTTTTCATAT ATCACAGGCA CACCATGTGT TGTTTTGGCT AATAATAATC ATAAAATTGA	12059
15	AGGAACATAC AAACATTGGT TGAATGAAGT CAACTATATT CGTTTTATTG AAAATCCGAC	12119
	TGTTGAAAAA ATTTTAGATG CAATCAATGA CTTAAAGCAA ATCGAACCTC ACTATATTGA	12179
	TTTATCTGAT AAATTTCAAC CACTAATTGA TGCGATAAAA GGGTAAAGGT TTA ATG Met 1	12235
20	AAT AAA TAT AAA AAA CTA CTA TCC AAC TCT CTT GTT TTC ACG ATA GGA Asn Lys Tyr Lys Lys Leu Leu Ser Asn Ser Leu Val Phe Thr Ile Gly 5 10 15	12283
	AAC TTA GGC AGC AAA CTG TTA GTC TTT TTA CTC GTA CCG CTC TAC ACC Asn Leu Gly Ser Lys Leu Leu Val Phe Leu Leu Val Pro Leu Tyr Thr 20 25 30	12331
25	TAT GCG ATG ACA CCG CAA GAG TAT GGT ATG GCA GAC TTA TAT CAA ACA Tyr Ala Met Thr Pro Gln Tyr Gly Met Ala Asp Leu Tyr Gln Thr 35 40 45	12379
	ACA GCA AAT CTA CTT TTG CCA TTA ATT ACA ATG AAT GTA TTT GAT GCA Thr Ala Asn Leu Leu Leu Pro Leu Ile Thr Met Asn Val Phe Asp Ala 50 55 60 65	12427
30	ACT TTA CGT TTT GCT ATG GAA AAG TCA ATG ACA AAA GAG AGT GTG TTA Thr Leu Arg Phe Ala Met Glu Lys Ser Met Thr Lys Glu Ser Val Leu 70 75 80	12475
	ACA AAT TCT CTT GTG GTT TGG TGT TTT AGC GCG GTG TTC ACT TGT TTG Thr Asn Ser Leu Val Val Trp Cys Phe Ser Ala Val Phe Thr Cys Leu 85 90 95	12523
35	GGC GCT TGT ATT ATC TAT GCG TTG AAC TTG AGT AAT AAA TGG TAT TTA Gly Ala Cys Ile Ile Tyr Ala Leu Asn Leu Ser Asn Lys Trp Tyr Leu 100 105 110	12571
	GCT TTA CTT TTA ACC TTC AAC TTA TTT CAA GGT GGA CAA AGT ATA TTA Ala Leu Leu Leu Thr Phe Asn Leu Phe Gln Gly Gly Gln Ser Ile Leu 115 120 125	12619
40	AGC CAG TAT GCT AGA GGT ATA GGA AAG TCG AAA ATA TTT GCA GCT GGC Ser Gln Tyr Ala Arg Gly Ile Gly Lys Ser Lys Ile Phe Ala Ala Gly 130 135 140 145	12667
	GGA GTT ATT TTA ACC TTT TTG ACA GGC GCT TTA AAT ATT CTT TTT TTG Gly Val Ile Leu Thr Phe Leu Thr Gly Ala Leu Asn Ile Leu Phe Leu 150 155 160	12715
45	GTA TAT TTA CCG CTT GGG ATT ACG GGC TAT TTA ATG TCC CTG GTT TTA Val Tyr Leu Pro Leu Gly Ile Thr Gly Tyr Leu Met Ser Leu Val Leu 165 170 175	12763
	GCG AAT GTA GGT ACG ATT CTA TTT TTT GCT GGC ACA CTT TCC ATT TGG Ala Asn Val Gly Thr Ile Leu Phe Phe Ala Gly Thr Leu Ser Ile Trp 180 185 190	12811
50	AAG GAA ATT AGT TTT AAA ATA ATT GAT AAA AAA CTG ATT TGG CAA ATG Lys Glu Ile Ser Phe Lys Ile Ile Asp Lys Lys Leu Ile Trp Gln Met	12859

55

EP 0 750 043 A1

	195	200	205	
5	CTC TAT TAT GCC TTA CCT TTG ATT CCT AGT TCC ATC CTG TGG TGG TTA Leu Tyr Tyr Ala Leu Pro Leu Ile Pro Ser Ser Ile Leu Trp Trp Leu 210 215 220 225	12907		
	CTG AAT GCT TCT AGT CGC TAT TTC GTT TTA TTC TTT TTA GGA GCA GGT Leu Asn Ala Ser Ser Arg Tyr Phe Val Leu Phe Phe Leu Gly Ala Gly 230 235 240	12955		
10	GCT AAT GGT CTT TTG GCG GTC GCT ACC AAA ATT CCA AGT ATT ATT TCC Ala Asn Gly Leu Leu Ala Val Ala Thr Lys Ile Pro Ser Ile Ile Ser 245 250 255	13003		
	ATT TTT AAT ACG ATT TTT ACA CAG GCG TGG CAA ATT TCA GCC ATA GAA Ile Phe Asn Thr Ile Phe Thr Gln Ala Trp Gln Ile Ser Ala Ile Glu 260 265 270	13051		
15	GAA TAT GAT TCT CAT CAA AAA TCA AAA TAT TAT TCG GAT GTT TTT CAC Glu Tyr Asp Ser His Gln Lys Ser Tyr Tyr Ser Asp Val Phe His 275 280 285	13099		
	TAC TTA GCA ACT TTT CTA TTG TTA GGG ACA TCA GCT TTT ATG ATT GTG Tyr Leu Ala Thr Phe Leu Leu Leu Gly Thr Ser Ala Phe Met Ile Val 290 295 300 305	13147		
20	CTT AAA CCA ATT GTC GAA AAA GTC GTT TCA AGT GAC TAT GCA AGT TCA Leu Lys Pro Ile Val Glu Lys Val Val Ser Ser Asp Tyr Ala Ser Ser 310 315 320	13195		
	TGG CAA TAT GTT CCT TTC TTT ATG TTG TCG ATG CTA TTT TCC TCG TTT Trp Gln Tyr Val Pro Phe Phe Met Leu Ser Met Leu Phe Ser Ser Phe 325 330 335	13243		
25	TCT GAT TTT TTT GGG ACT AAT TAT ATT GCG GCT AAA CAA ACA AAA GGC Ser Asp Phe Phe Gly Thr Asn Tyr Ile Ala Ala Lys Gln Thr Lys Gly 340 345 350	13291		
	GTA TTT ATG ACA TCT ATC TAT GGT ACC ATT GTT TGT GTC TTA CTC CAA Val Phe Met Thr Ser Ile Tyr Gly Thr Ile Val Cys Val Leu Leu Gln 355 360 365	13339		
30	GTG GTG CTG CTA CCC ATC ATC GGC TTG GAT GGC GCA GGT TTA TCA GCC Val Val Leu Leu Pro Ile Ile Gly Leu Asp Gly Ala Gly Leu Ser Ala 370 375 380 385	13387		
	ATG CTT GGA TTT TTA ACA ACG TTT TTA TTG CGT GTC AAA GAT ACG CAA Met Leu Gly Phe Leu Thr Thr Phe Leu Arg Val Lys Asp Thr Gln 390 395 400	13435		
35	AAA TTT GTG GTG ATT CAG ATT AAG TGG CGG ATT TTT ATC AGT AAT TTA Lys Phe Val Val Ile Gln Ile Lys Trp Arg Ile Phe Ile Ser Asn Leu 405 410 415	13483		
	TTG ATC GTT TTG GCA CAA ATT TTA TGT TTG TTT TAT CTA CCG AGT GAA Leu Ile Val Leu Ala Gln Ile Leu Cys Leu Phe Tyr Leu Pro Ser Glu 420 425 430	13531		
40	TTT TTG TAT TTT GGT CTT GCC CTA TTA TTT TGT GGC ATG TTA GTG GTT Phe Leu Tyr Phe Gly Leu Ala Leu Leu Phe Cys Gly Met Leu Val Val 435 440 445	13579		
	AAT CAG CGT ACA ATT TTA TAC ATT ATC ATG GCG CTA AAA ATA AAA AAT Asn Gln Arg Thr Ile Leu Tyr Ile Ile Met Ala Leu Lys Ile Lys Asn 450 455 460 465	13627		
45	AAG ACA TTT GGA ATG AAA TCC TCA TAAAAATAGA CAGGAGGTGT ATCTCGAATG Lys Thr Phe Gly Met Lys Ser Ser 470	13681		
	GTATCGAGAT ATATCTCCTG TCTATTTTGA TGATACTTTT GTGTTAGCTC AACTCAACCG	13741		
50	CCTTTTAAATC TCCCAACAAC AATAATACCC AATCAAACAA CCCAAAAAAT TCAAGATAAT	13801		
	ATCACTAATG GCAAAATGTGC CCAAAATAAAA GATAAAATTGA ATGGTTTCAA TTAATAAAAG	13861		
	AGTGACCAAA CTGACAATGA CAAACTGTTT GAAATCAGTA TTGATACAGT AAAGGCCACC	13921		
55				

TAAAGGAATG AAGTAGATAA TATTTAGCAC AGCCTCTTGA ATCGTTCTGG GATCCGCTTT 13981
 TATAAAGTCA AAAGGATTCA GTGACATCGC CTGAAAATCC GTTATTTTAG TAAAAAGTAC 14041
 5 CATGAATAAC AGTAATAAAT ACACACTGAA AGCAAGATAG AGATAAATAA CTGAAAAATA 14101
 TTTGAGGTGA TACTGGATAC CAAACAACCA GATAATCAGC GTTAATAAGA GTATTAAAGT 14161
 CAATGTGGTA TAGTCAAAGT GGTTAATCAA CTTAGCCAGG CTTTGATAGC GAGTGAGAAC 14221
 GGGCATAATC AGCCAAGTAA TCGTCGCATA ACTCAGGATA AATGTGATCA ATAAACTGCT 14281
 10 GAGGTAGATC ATATATTTTC GCAACTGTTT CTAACCTCCTT TTCTTGATGA GATTAAACCCT 14341
 ATTTTAACAT ATTTTAAAC TGTCATGTTT TTATGAATTT AAAATAAATG TTAAAGAAAA 14401
 TAAAAATTCA CCAGTTGGTT CTGTTGCAAA GTTTTCCAAA AAATCTATTT TAGTGTAATA 14461
 15 TTGAGAAAAA AGACAGAGAG GACAGAGTAA TGAATTATTT TAAAGGCAAA CAATTCAAAA 14521
 AAGACGTCAT TATTGTCTCT GTTGGTTACT ACCTGCGTTA CAATCTAAGC TATCGTTAAG 14581
 TTCAGGAATT GTTATATGAT C 14602

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 484 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Ser Arg Thr Asn Arg Lys Gln Lys His Thr Ser Asn Gly Ser
 1 5 10 15
 Trp Gly Met Val Asn Val Gly Leu Thr Ile Leu Tyr Ala Ile Leu Ala
 20 25 30
 Leu Val Leu Leu Phe Thr Met Phe Asn Tyr Asn Phe Leu Ser Phe Arg
 35 40 45
 Phe Leu Asn Ile Ile Ile Thr Ile Gly Leu Leu Val Val Leu Ala Ile
 50 55 60
 35 Ser Ile Phe Leu Gln Lys Thr Lys Lys Leu Pro Leu Val Thr Thr Val
 65 70 75 80
 Val Leu Val Ile Phe Ser Leu Val Ser Leu Val Gly Ile Phe Gly Phe
 85 90 95
 40 Lys Gln Met Ile Asp Ile Thr Asn Arg Met Asn Gln Thr Ala Ala Phe
 100 105 110
 Ser Glu Val Glu Met Ser Ile Val Val Pro Lys Glu Ser Asp Ile Lys
 115 120 125
 Asp Val Ser Gln Leu Thr Ser Val Gln Ala Pro Thr Lys Val Asp Lys
 130 135 140
 45 Asn Asn Ile Glu Ile Leu Met Ser Ala Leu Lys Lys Asp Lys Lys Val
 145 150 155 160
 Asp Val Lys Val Asp Asp Val Ala Ser Tyr Gln Glu Ala Tyr Asp Asn
 165 170 175
 50 Leu Lys Ser Gly Lys Ser Lys Ala Met Val Leu Ser Gly Ser Tyr Ala
 180 185 190
 Ser Leu Leu Glu Ser Val Asp Ser Asn Tyr Ala Ser Asn Leu Lys Thr
 195 200 205

EP 0 750 043 A1

Ile Tyr Thr Tyr Lys Ile Lys Lys Lys Asn Ser Asn Ser Ala Asn Gln
 210 215 220
 Val Asp Ser Arg Val Phe Asn Ile Tyr Ile Ser Gly Ile Asp Thr Tyr
 225 230 235 240
 Gly Pro Ile Ser Thr Val Ser Arg Ser Asp Val Asn Ile Ile Met Thr
 245 250 255
 Val Asn Met Asn Thr His Lys Ile Leu Leu Thr Thr Thr Pro Arg Asp
 260 265 270
 Ala Tyr Val Lys Ile Pro Gly Gly Gly Ala Asp Gln Tyr Asp Lys Leu
 275 280 285
 Thr His Ala Gly Ile Tyr Gly Val Glu Thr Ser Glu Gln Thr Leu Glu
 290 295 300
 Asp Leu Tyr Gly Ile Lys Leu Asp Tyr Tyr Ala Arg Ile Asn Phe Thr
 305 310 315 320
 Ser Phe Leu Lys Leu Ile Asp Gln Leu Gly Gly Val Thr Val His Asn
 325 330 335
 Asp Gln Ala Phe Thr Gln Glu Lys Phe Asp Phe Pro Val Gly Asp Ile
 340 345 350
 Gln Met Asn Ser Glu Gln Ala Leu Gly Phe Val Arg Glu Arg Tyr Asn
 355 360 365
 Leu Asp Gly Gly Asp Asn Asp Arg Gly Lys Asn Gln Glu Lys Val Ile
 370 375 380
 Ser Ala Ile Leu Asn Lys Leu Ala Ser Leu Lys Ser Val Ser Asn Phe
 385 390 395 400
 Thr Ser Ile Val Asn Asn Leu Gln Asp Ser Val Gln Thr Asn Met Ser
 405 410 415
 Leu Asn Thr Ile Asn Ala Leu Ala Asn Thr Gln Leu Glu Ser Gly Ser
 420 425 430
 Lys Phe Thr Val Thr Ser Gln Ala Val Thr Gly Thr Gly Ser Thr Gly
 435 440 445
 Gln Leu Ile Ser Tyr Ala Met Pro Asn Ser Ser Leu Tyr Met Met Lys
 450 455 460
 Leu Asp Asn Ser Ser Val Glu Ser Ala Ser Gln Ala Ile Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Met Glu Glu Lys

40

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 243 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
 - (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 - (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

45

Val Ile Asp Val His Ser His Ile Val Phe Asp Val Asp Asp Gly Pro
 1 5 10 15
 Glu Thr Leu Glu Glu Ser Leu Asp Leu Ile Gly Glu Ser Tyr Ala Gln
 20 25 30
 Gly Val Arg Lys Ile Val Ser Thr Ser His Arg Arg Lys Gly Met Phe
 35 40 45

50

55

Glu Thr Pro Glu Asp Lys Ile Phe Ala Asn Phe Lys Lys Val Lys Ala
 50 55 60
 5 Glu Ala Glu Ala Leu Tyr Pro Asp Leu Thr Ile Tyr Tyr Gly Gly Glu
 65 70 75 80
 Leu Tyr Tyr Thr Ser Asp Ile Val Glu Lys Leu Glu Lys Asn Leu Ile
 85 90 95
 Pro Arg Met His Asn Thr Gln Phe Ala Leu Ile Glu Phe Ser Ala Arg
 100 105 110
 10 Thr Ser Trp Lys Glu Ile His Ser Gly Leu Ser Asn Val Leu Arg Ala
 115 120 125
 Gly Val Thr Pro Ile Val Ala His Ile Glu Arg Tyr Asp Ala Leu Glu
 130 135 140
 15 Glu Asn Ala Asp Arg Val Arg Glu Ile Ile Asn Met Gly Cys Tyr Thr
 145 150 155 160
 Gln Val Asn Ser Ser His Val Leu Lys Pro Lys Leu Phe Gly Asp Lys
 165 170 175
 Asp Lys Val Arg Lys Lys Arg Val Arg Phe Phe Leu Glu Lys Asn Leu
 180 185 190
 20 Val His Met Val Ala Ser Asp Met His Asn Leu Gly Pro Arg Pro Pro
 195 200 205
 Phe Met Lys Asp Ala Tyr Glu Ile Val Lys Lys Asn Tyr Gly Ser Lys
 210 215 220
 25 Arg Ala Lys Asn Leu Phe Ile Glu Asn Pro Lys Thr Leu Leu Glu Asn
 225 230 235 240
 Gln Tyr Leu

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 231 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

35 Met Asn Gln Asp Asn Thr Lys Ser Asp Glu Ile Asp Val Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu His Lys Leu Trp Thr Lys Lys Leu Leu Ile Leu Phe Thr Ala Phe
 20 25 30
 40 Tyr Phe Ala Val Phe Ser Phe Leu Gly Thr Tyr Phe Phe Ile Gln Pro
 35 40 45
 Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Arg Ile Tyr Val Val Asn Gln Ala Thr Asp
 50 55 60
 Asn Lys Asn Leu Ser Ala Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Tyr Leu Ala
 65 70 75 80
 45 Asn Asp Tyr Lys Glu Ile Ile Ala Ser Asn Asp Val Leu Ser Glu Val
 85 90 95
 Ile Lys Asp Glu Lys Leu Asn Leu Ser Glu Ala Glu Leu Ser Lys Met
 100 105 110
 Val Ser Val Asn Ile Pro Thr Asp Thr Arg Leu Ile Ser Ile Ser Val
 115 120 125
 50 Asn Ala Lys Thr Gly Gln Asp Ala Gln Thr Leu Ala Asn Lys Val Arg
 130 135 140

55

EP 0 750 043 A1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Glu Val Ala Ser Lys Lys Ile Lys Lys Val Thr Lys Val Glu Asp Val
145 150 155 160
Thr Thr Leu Glu Glu Ala Lys Leu Pro Glu Ser Pro Ser Ser Pro Asn
165 170 175
Ile Lys Leu Asn Val Leu Leu Gly Ala Val Leu Gly Gly Phe Leu Ala
180 185 190
Val Val Gly Val Leu Val Arg Glu Ile Leu Asp Asp Arg Val Arg Arg
195 200 205
Pro Glu Asp Val Glu Asp Ala Leu Gly Met Thr Leu Leu Gly Ile Val
210 215 220
Pro Asp Thr Asp Lys Ile
225 230

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 249 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Met Pro Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Lys Val Asp Phe Ala Lys Lys
1 5 10 15
Thr Glu Glu Tyr Tyr Asn Ala Ile Arg Thr Asn Ile Gln Phe Ser Gly
20 25 30
Ala Gln Met Lys Val Ile Ala Ile Ser Ser Val Glu Ala Gly Glu Gly
35 40 45
Lys Ser Met Ile Ser Val Asn Leu Ala Ile Ser Phe Ala Ser Val Gly
50 55 60
Leu Arg Thr Leu Leu Ile Asp Ala Glu Thr Arg Asn Ser Val Leu Ser
65 70 75 80
Gly Thr Phe Lys Ser Asn Glu Pro Tyr Lys Gly Leu Ser Asn Phe Leu
85 90 95
Ser Gly Asn Ala Asp Leu Asn Glu Thr Ile Cys Gln Thr Asp Ile Ser
100 105 110
Gly Leu Asp Val Ile Ala Ser Gly Pro Val Pro Pro Asn Pro Thr Ser
115 120 125
Leu Leu Gln Asn Asp Asn Phe Arg His Leu Met Glu Val Ala Arg Ser
130 135 140
Cys Tyr Asp Tyr Val Ile Ile Asp Thr Pro Pro Val Gly Leu Val Ile
145 150 155 160
Asp Ala Val Ile Ile Ala His Gln Ala Asp Ala Ser Leu Leu Val Thr
165 170 175
Glu Ala Gly Lys Ile Lys Arg Arg Phe Val Thr Lys Ala Val Glu Gln
180 185 190
Leu Val Glu Ser Gly Ser Gln Phe Leu Gly Val Val Leu Asn Lys Val
195 200 205
Asp Met Thr Val Asp Lys Tyr Gly Phe Tyr Gly Ser Tyr Gly Ser Tyr
210 215 220
Gly Glu Tyr Gly Lys Lys Ser Asp Gln Lys Glu Gly His Ser Arg Ala
225 230 235 240
His Arg Arg Arg Lys Val Gly Trp Asn

245

5

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 227 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

10

Met Ser Gln Ala Lys Glu Glu Ile Ser Asp Val Met Thr Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Leu Thr Ser His Lys Pro Lys Ile Ile Tyr Ser Leu Ile Lys Arg Ile
 20 25 30
 Gly Asp Ile Leu Val Ser Ser Ile Gly Leu Ile Ile Leu Ile Pro Leu
 35 40 45
 Phe Leu Ile Val Ala Leu Ile Met Lys Cys Ser Glu Pro Thr Ala Pro
 50 55 60
 Ile Phe Phe Ser His Ile Arg Asn Gly Lys Asn Gly Lys Lys Phe Lys
 65 70 75 80
 Met Tyr Lys Phe Arg Thr Met Cys Gln Asp Ala Glu Ser Ile Leu Met
 85 90 95
 Lys Asp Thr Glu Leu Phe Ala Lys Phe Lys Ala Asn Gly Tyr Lys Leu
 100 105 110
 Glu Thr His Glu Asp Pro Arg Ile Thr Lys Ile Gly Gly Ile Leu Arg
 115 120 125
 Lys Thr Ser Ile Asp Glu Leu Pro Gln Leu Ile Asn Val Phe Leu Gly
 130 135 140
 Gln Met Ser Leu Val Gly Pro Arg Pro Leu Pro Asp Arg Glu Ile Ile
 145 150 155 160
 Glu Tyr Gly Asp Asn Gln Glu Lys Phe Leu Ser Val Lys Pro Gly Met
 165 170 175
 Thr Gly Trp Trp Gln Val Ser Gly Arg Ser Thr Ile Gly Tyr Pro Glu
 180 185 190
 Arg Cys His Leu Glu Leu Tyr Tyr Val Glu Lys Cys Cys Phe Thr Phe
 195 200 205
 Asp Val Leu Ile Leu Leu Lys Thr Ile Gly Ile Val Leu Lys Arg Val
 210 215 220
 Gly Ala Arg
 225

40

45

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 319 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

50

Met Asn Glu Gln Val Thr Phe Ile Leu Cys Asp Phe Leu Val Arg Glu
 1 5 10 15
 Ile Lys Pro Lys Tyr Asp Leu Leu Ala Tyr Gln Phe Ile Ser Lys Lys
 20 25 30

55

Ile Lys Glu Ile Lys Pro Asp Ile Val His Cys His Ser Ser Lys Ala
 35 40 45
 Gly Val Ile Gly Arg Leu Ala Ala Lys Arg Arg Gly Val Lys Lys Ile
 5 50 55 60
 Phe Tyr Thr Pro His Ala Tyr Ser Phe Leu Ala Pro Glu Phe Ser Gly
 65 70 75 80
 Lys Lys Lys Phe Leu Phe Val Gln Ile Glu Lys Phe Leu Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ala Thr Thr Lys Ile Phe Cys Val Ser Ile Ala Glu Met Gln Ala Ala
 10 100 105 110
 Leu Glu Val Asn Leu Asp Lys Thr Asp Lys Phe Gln Val Ile Tyr Asn
 115 120 125
 Gly Leu Pro Glu Ile Asp Leu Pro Ser Lys Glu Thr Ile Arg Ala Gln
 130 135 140
 Leu Gly Leu Glu Lys Ala Ala Val Val Ile Gly Asn Asn Ala Lys Met
 145 150 155 160
 Ser Glu Gln Lys Asn Pro Met Phe Phe Met Glu Ile Ala Arg Lys Met
 165 170 175
 Ile Arg Gln Asn Ala Asn Trp His Phe Val Trp Val Gly Asp Gly Gln
 180 185 190
 Leu Met Pro Leu Phe Gln Ser Phe Ile Lys Gln Asn Gly Leu Glu Gly
 195 200 205
 Asn Ile His Leu Leu Gly Glu Arg Pro Asp Ser Glu Ile Val Val Thr
 210 215 220
 Ala Tyr Asp Ile Phe Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Glu Gly Leu Pro Tyr
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Pro Ile Leu Ala Thr Lys
 245 250 255
 Val Val Gly Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu Gly Lys Asn Gly Tyr Leu
 260 265 270
 Ile Asp Leu Glu Trp Ser Lys Ser Val Glu Glu Lys Leu Tyr Lys Ala
 275 280 285
 Ala Lys Ile Asp Ala Gln Met Ile Lys Ala Asp Phe Arg Gln Arg Phe
 290 295 300
 Ala Ile Asp Gln Ile Leu Lys Gln Ile Glu Thr Ile Tyr Leu Ala
 305 310 315

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 372 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Met Lys Lys Ile Ser Ile Leu His Phe Ser Gln Val Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Lys Tyr Ile Lys Leu Phe Leu Lys Tyr Ser Asp Val Thr Lys
 20 25 30
 Phe Asn Asn Tyr Leu Val Ala Pro Asn Leu Glu Asn Tyr Asp Glu Phe
 35 40 45
 Asn Gly Tyr Leu Lys Met Ser Val Asn Phe Asn Met Glu Gln Thr Phe
 50 55 60
 Ser Pro Leu Lys Ile Phe Lys Asn Val Phe Phe Ile Arg Ser Val Leu

55

EP 0 750 043 A1

	65		70		75		80									
	Lys	Lys	Ile	Asn	Pro	Asp	Ile	Val	Tyr	Leu	His	Ser	Thr	Phe	Ala	Gly
				85						90					95	
5	Val	Val	Gly	Arg	Ile	Ala	Ser	Ile	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys	Val	Val	Tyr
			100						105					110		
	Asn	Pro	His	Gly	Trp	Ser	Phe	Lys	Met	Asp	Asn	Ser	Tyr	Leu	Lys	Lys
			115					120					125			
10	Leu	Ile	Phe	Lys	Leu	Ile	Glu	Phe	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Thr	Asp	Lys
		130				135						140				
	Phe	Ile	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Glu	Tyr	Ile	Leu	Ala	Asn	His	Ile	Ser
	145				150						155				160	
	Phe	Asn	Lys	Ser	Lys	Phe	Ser	Leu	Ile	Asn	Asn	Gly	Val	Glu	Val	Ile
				165						170				175		
15	Thr	Gly	Asp	Ser	Arg	Asn	Glu	Ile	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Glu	Asp
				180					185					190		
	Phe	Ile	Ile	Gly	Met	Val	Gly	Arg	Leu	Ser	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Phe
		195						200					205			
20	Phe	Phe	Ile	Asp	Phe	Ala	Lys	Lys	Ile	Leu	Gln	Ile	Arg	Asn	Asp	Thr
		210					215					220				
	Asn	Phe	Ile	Ile	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Ile	Glu	Arg
	225				230						235				240	
	Met	Ile	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	Gly	Asp	Lys	Ile	Tyr	Ile	Thr	Gly	Trp
				245						250					255	
25	Val	Asp	Asn	Pro	Arg	Asn	Tyr	Ile	Glu	Lys	Phe	Asp	Gln	Ala	Ile	Leu
				260					265					270		
	Phe	Ser	Arg	Trp	Glu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Ile	Ala	Glu	Tyr	Met	Ser
		275						280					285			
30	Gln	Lys	Lys	Thr	Ile	Leu	Ala	Thr	Asn	Ile	Gly	Gly	Ile	Asn	Asp	Leu
		290				295						300				
	Ile	Thr	Asp	Gly	Glu	Thr	Gly	Met	Leu	Ile	Glu	Val	Gly	Asp	Leu	Asn
	305				310						315				320	
	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Ser	Phe	Glu	Leu	Arg	Asn	Asn	Lys	Glu	Val	Ser
				325						330				335		
35	Asn	Gln	Leu	Ala	Asn	Asn	Ala	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Glu	Gln	Phe	Ser
			340						345					350		
	Ile	Glu	Lys	Gln	Met	Ala	Glu	Ile	Glu	Ser	Leu	Phe	Ile	Glu	Met	Cys
		355					360						365			
40	Asn	Asn	Glu	Lys												
			370													

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 159 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Met	Leu	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys	Phe	His	Leu	Lys	Ser	Leu	Phe	Leu	Lys
1				5					10				15		
Trp	Ile	Tyr	Arg	Leu	Leu	Tyr	Leu	Lys	Lys	Phe	Gln	Phe	Gly	Ala	Arg
			20				25						30		

Leu Thr Phe Arg Asp Gly Phe His Leu Leu Ile Glu Lys Ser Gly Lys
 35 40 45
 Val Ile Ile Gly Asn His Val Phe Phe Asn Asn Phe Cys Ser Ile Asn
 5 50 55 60
 Ala Met Leu Ser Val Thr Ile Gly Asp Asp Cys Ile Phe Gly Glu Asn
 65 70 75 80
 Val Lys Ile Tyr Asp His Asn His Cys Tyr Gln Asn Lys Ser Gln Pro
 85 90 95
 10 Ile Ser Lys Gln Gly Phe Ser Thr Ala Ala Ile Gln Ile Gly Arg Asn
 100 105 110
 Cys Trp Ile Gly Ser Gln Val Thr Ile Leu Lys Gly Val Thr Ile Gly
 115 120 125
 15 Asp Asn Ser Ile Ile Gly Ala Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Val Pro
 130 135 140
 Glu Asn Ser Ile Val Leu Ser Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Gly
 145 150 155

20

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 324 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Met Tyr Leu Lys Ser Leu Ile Ser Ile Val Ile Pro Val Tyr Asn Val
 1 5 10 15
 Glu Lys Tyr Leu Glu Lys Cys Leu Gln Ser Val Gln Asn Gln Thr Tyr
 20 25 30
 30 Asn Asn Phe Glu Val Ile Leu Val Asn Asp Gly Ser Thr Asp Ser Ser
 35 40 45
 Leu Ser Ile Cys Glu Lys Phe Val Asn Gln Asp Lys Arg Phe Ser Val
 50 55 60
 35 Phe Ser Lys Glu Asn Gly Gly Met Ser Ser Ala Arg Asn Phe Gly Ile
 65 70 75 80
 Lys Lys Ala Lys Gly Ser Phe Ile Thr Phe Val Asp Ser Asp Asp Tyr
 85 90 95
 40 Ile Val Lys Asp Tyr Leu Ser His Leu Val Ala Gly Ile Lys Ser Glu
 100 105 110
 Thr Ser Ile Val Cys Ser Lys Phe Phe Leu Val Asp Glu Lys Gly Ser
 115 120 125
 Leu Leu Thr Lys Lys Glu Ala Pro Lys Lys Lys Ser Glu Val Val Ser
 130 135 140
 45 Ile Glu Glu Ser Ile Lys Ile Leu Leu Leu Gln Gln Asn Gly Tyr Asp
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Trp Gly Lys Leu Tyr Pro Val Ser Phe Phe Glu Thr Ile
 165 170 175
 50 Ser Phe Pro Glu Gly Lys Leu Tyr Glu Asp Met Gly Thr Thr Tyr Lys
 180 185 190
 Leu Leu Lys Leu Ala Ser Glu Val Val Phe Leu Asp Ala Tyr Asp Tyr
 195 200 205

55

Ala Tyr Val Gln Arg Pro Asn Ser Ile Met Asn Ser Ser Phe Asn Leu
 210 215 220
 5 Lys Lys Leu Asp Ile Ile Glu Met Val His Glu Met Glu Asn Asp Ile
 225 230 235 240
 Leu Ala Gln Phe Pro Asn Leu Ala Leu Tyr Val Lys Asn Arg Ala Phe
 245 250 255
 Ala Ala Glu Val Lys Ile Phe Leu Glu Ile Pro Lys Glu Lys Glu Phe
 260 265 270
 10 Glu Gln Ala Gln Lys Gln Leu Trp His Asp Ile Lys Lys Asn Arg Lys
 275 280 285
 Ala Pro Phe Met Thr Lys Gly Ala Arg Leu Lys Asn Arg Leu Gly Ala
 290 295 300
 15 Ser Leu Ser Phe Leu Gly Lys Ser Leu Phe Leu Thr Ile Gly Lys Gln
 305 310 315 320
 Leu Val Asp Arg

20

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 360 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Met Val Ile Tyr Phe Leu Leu Phe Pro Met Ile Ala Met Ile Tyr Leu
 1 5 10 15
 Met Thr Leu Leu Arg Gln Lys Ala Gln Ile Gln Lys Thr Ile Phe
 20 25 30
 30 Cys Val Leu Thr Phe Gly Thr Leu Gly Phe Ile Ser Ala Ser Arg Ala
 35 40 45
 Ser Ser Val Gly Thr Asp Val Thr Leu Tyr Glu Asn Ile Phe Lys Ser
 50 55 60
 35 Ile Asn Tyr Gly Ile Ser Ala Glu Asn Asn Trp Gly Tyr Val Ile Tyr
 65 70 75 80
 Asn Lys Leu Ile Gly Ser Val Phe Gly Tyr Thr Gly His Glu Ile Thr
 85 90 95
 40 Ala Ala Asn Ser Val Leu Ile Thr Ile Leu Ile Gly Ile Phe Ile Trp
 100 105 110
 Lys Val Ala Glu His Tyr Phe Val Ala Thr Phe Leu Tyr Ile Ser Leu
 115 120 125
 Phe Tyr Tyr Ala Thr Ser Phe Asn Ile Ser Arg Gln Phe Ile Ala Met
 130 135 140
 45 Gly Leu Val Leu Val Ala Ile Ser Phe Ala Leu Asp Lys Lys Val Met
 145 150 155 160
 Pro Trp Phe Ile Leu Thr Val Leu Ala Thr Leu Phe His Ala Thr Ala
 165 170 175
 50 Ile Val Ala Phe Pro Val Tyr Trp Leu Thr Lys Val His Trp Asp Val
 180 185 190
 Lys Lys Thr Leu Ser Ile Phe Pro Ile Thr Ile Phe Ala Ser Phe Ile
 195 200 205
 55

Phe Asp Ala Ile Leu Asn Ile Phe Val Arg Phe Phe Pro His Tyr Glu
 210 215 220
 Met Tyr Ile Thr Gly Thr Gln Phe Asn Ile Ser Asp Gln Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Arg Val Val Leu Val Lys Ile Phe Ile Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu
 245 250 255
 Phe Leu Phe Tyr Lys Lys Ser Tyr Ala Leu Ile Ser Glu Cys His Gln
 260 265 270
 Ser Leu Ile Ala Leu Thr Thr Val Gly Leu Ser Ile Gly Ile Val Phe
 275 280 285
 Tyr Asn Asn Ile Leu Leu Asn Arg Ile Glu Met Phe Tyr Ser Ile Leu
 290 295 300
 Ser Ile Val Phe Ile Pro Ile Ala Ile Asp Tyr Ile Ser Leu Lys Phe
 305 310 315 320
 Lys Gln Lys Asp Ala Val Arg Leu Met Leu Thr Ile Gly Ile Leu Leu
 325 330 335
 Ile Thr Leu Val Pro Tyr Tyr Ile Gln Val Ser Gly Asn Tyr Ser Gly
 340 345 350
 Ile Leu Pro Tyr Val Ile Gln Gln
 355 360

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 316 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Met Glu Asp Arg Lys Lys Gln Val Ile Leu Ile Leu Ser His Arg Asn
 1 5 10 15
 Thr Leu Ala Leu Lys Ser Thr Ile Glu Leu Leu Asp Ser Gln Tyr Phe
 20 25 30
 Asp Phe Phe Leu His Ile Asp Lys Lys Ser Arg Ile Gln Asp Phe Phe
 35 40 45
 Tyr Leu Lys Lys Ile Thr Lys Phe Ser Thr Ile His Phe Ser Glu Arg
 50 55 60
 Lys Asn Val His Trp Gly Gly Phe Ser Met Val Glu Ala Met Phe Ala
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Cys Ala Arg Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Tyr Phe His Phe
 85 90 95
 Leu Ser Gly Asp Asp Met Pro Ile Lys Asp Asn Glu Ile Val Phe Asn
 100 105 110
 Phe Phe Glu Asn Ser Tyr Pro Lys Asn Phe Ile Asp Ile Leu Asp Phe
 115 120 125
 Glu Asn Val Asn Lys Asn Ser Tyr Phe Tyr Glu Pro Pro Glu Met Ile
 130 135 140
 Glu Glu Arg Val Lys Tyr Tyr Pro His Met Asp Ile Leu Asn Arg
 145 150 155 160
 Lys Gly Thr Asn Phe Ile Gly Lys Lys Leu Ile Tyr Leu Gln Lys Leu
 165 170 175
 Leu Lys Val Asn Arg Leu Lys Asn Arg Glu Ile Glu Ile Phe Lys Gly

EP 0 750 043 A1

	180	185	190
	His Gln Trp Cys Ser Leu Thr	Asn Gln Phe Val Asp	Ile Leu Leu Asp
	195	200	205
5	Lys Glu Glu Arg Arg Val Gly	Lys Ser Tyr Phe Ser	Ser Ser Leu Ile
	210	215	220
	Pro Asp Glu Cys Tyr Phe Gln Thr Phe Ala Met	Ile Lys Lys Val Glu	
	225	230	235
10	Ile Tyr Gln Gln Lys Asn Met Ser Ala Arg	Leu Ile Asp Trp Thr Arg	
	245	250	255
	Gly Lys Pro Tyr Ile Trp Arg Gln Asp Asp Phe Phe Glu	Ile Met Asn	
	260	265	270
	Asp Lys Asp Ser Met Phe Ser Arg Lys Phe Asp Glu	Asn Val Asp Arg	
	275	280	285
15	Lys Ile Ile Glu Glu Ile Tyr Ile Lys Ile Arg Gly	Arg Ser Thr Asp	
	290	295	300
	Glu Ala Asn Lys Ile Lys Asp Lys Arg Phe Thr Lys		
	305	310	315

20

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 473 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

25

	Met Asn Lys Tyr Lys Lys Leu Leu Ser Asn Ser Leu Val Phe Thr Ile	
	1	5 10 15
30	Gly Asn Leu Gly Ser Lys Leu Leu Val Phe Leu Leu Val Pro Leu Tyr	
	20 25 30	
	Thr Tyr Ala Met Thr Pro Gln Glu Tyr Gly Met Ala Asp Leu Tyr Gln	
	35 40 45	
	Thr Thr Ala Asn Leu Leu Leu Pro Leu Ile Thr Met Asn Val Phe Asp	
	50 55 60	
35	Ala Thr Leu Arg Phe Ala Met Glu Lys Ser Met Thr Lys Glu Ser Val	
	65 70 75 80	
	Leu Thr Asn Ser Leu Val Val Trp Cys Phe Ser Ala Val Phe Thr Cys	
	85 90 95	
40	Leu Gly Ala Cys Ile Ile Tyr Ala Leu Asn Leu Ser Asn Lys Trp Tyr	
	100 105 110	
	Leu Ala Leu Leu Leu Thr Phe Asn Leu Phe Gln Gly Gly Gln Ser Ile	
	115 120 125	
	Leu Ser Gln Tyr Ala Arg Gly Ile Gly Lys Ser Lys Ile Phe Ala Ala	
	130 135 140	
45	Gly Gly Val Ile Leu Thr Phe Leu Thr Gly Ala Leu Asn Ile Leu Phe	
	145 150 155 160	
	Leu Val Tyr Leu Pro Leu Gly Ile Thr Gly Tyr Leu Met Ser Leu Val	
	165 170 175	
50	Leu Ala Asn Val Gly Thr Ile Leu Phe Phe Ala Gly Thr Leu Ser Ile	
	180 185 190	
	Trp Lys Glu Ile Ser Phe Lys Ile Ile Asp Lys Lys Leu Ile Trp Gln	
	195 200 205	

55

Met Leu Tyr Tyr Ala Leu Pro Leu Ile Pro Ser Ser Ile Leu Trp Trp
 210 215 220
 5 Leu Leu Asn Ala Ser Ser Arg Tyr Phe Val Leu Phe Phe Leu Gly Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Asn Gly Leu Leu Ala Val Ala Thr Lys Ile Pro Ser Ile Ile
 245 250 255
 Ser Ile Phe Asn Thr Ile Phe Thr Gln Ala Trp Gln Ile Ser Ala Ile
 260 265 270
 10 Glu Glu Tyr Asp Ser His Gln Lys Ser Lys Tyr Tyr Ser Asp Val Phe
 275 280 285
 His Tyr Leu Ala Thr Phe Leu Leu Leu Gly Thr Ser Ala Phe Met Ile
 290 295 300
 15 Val Leu Lys Pro Ile Val Glu Lys Val Val Ser Ser Asp Tyr Ala Ser
 305 310 315 320
 Ser Trp Gln Tyr Val Pro Phe Phe Met Leu Ser Met Leu Phe Ser Ser
 325 330 335
 Phe Ser Asp Phe Phe Gly Thr Asn Tyr Ile Ala Ala Lys Gln Thr Lys
 340 345 350
 20 Gly Val Phe Met Thr Ser Ile Tyr Gly Thr Ile Val Cys Val Leu Leu
 355 360 365
 Gln Val Val Leu Leu Pro Ile Ile Gly Leu Asp Gly Ala Gly Leu Ser
 370 375 380
 25 Ala Met Leu Gly Phe Leu Thr Thr Phe Leu Leu Arg Val Lys Asp Thr
 385 390 395 400
 Gln Lys Phe Val Val Ile Gln Ile Lys Trp Arg Ile Phe Ile Ser Asn
 405 410 415
 Leu Leu Ile Val Leu Ala Gln Ile Leu Cys Leu Phe Tyr Leu Pro Ser
 420 425 430
 30 Glu Phe Leu Tyr Phe Gly Leu Ala Leu Leu Phe Cys Gly Met Leu Val
 435 440 445
 Val Asn Gln Arg Thr Ile Leu Tyr Ile Ile Met Ala Leu Lys Ile Lys
 450 455 460
 35 Asn Lys Thr Phe Gly Met Lys Ser Ser
 465 470
 40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 307 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
 45 Met Lys Gln Ile Lys Ser Lys Ile Arg Asp Leu Gln Asn Asn Phe Thr
 1 5 10 15
 Tyr Val Phe Gly Lys Lys Thr Phe Leu Gly Arg Gly Glu Ala Ile Ile
 20 25 30
 50 Ile Asp Glu Pro Glu His Gly Asn Leu Gly Asp Gln Ala Ile Ala Phe
 35 40 45
 Ala Glu Asn Gln Phe Leu Val Asn His Val Ser Val Arg Asp Val Glu
 50 55 60

5 His Leu Ile Glu Ser Lys Thr Ile Ser Glu Ile Lys Ser Ile Lys Lys
 65 70 75 80
 Asn Ile Gly Lys Lys Glu Leu Val Phe Phe His Gly Gly Gly Asn Phe
 85 90 95
 Gly Thr Leu Tyr Leu Lys Tyr Glu Arg Ile Arg Arg Leu Ala Val Ser
 100 105 110
 Lys Leu Pro Phe Asn Lys Met Ile Leu Phe Pro Gln Ser Ile Ser Phe
 115 120 125
 10 Glu Asp Ser Arg Phe Gly Gln Lys Gln Leu Asn Lys Ser Lys Lys Ile
 130 135 140
 Tyr Ser Gln Asn Thr Asn Phe Ile Leu Thr Ala Arg Glu Pro Lys Ser
 145 150 155 160
 15 Tyr Gly Leu Met Lys Lys Cys Phe Pro Tyr Asn Lys Val Ile Leu Thr
 165 170 175
 Pro Asp Ile Val Leu Ser Phe Lys Phe Glu Val Thr Ile Ser Asp Thr
 180 185 190
 His Ile Gly Lys Glu Lys Asp Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Arg Gln
 195 200 205
 20 His Tyr Leu Glu Ile Lys Trp Asp Glu Ile Ala Gln His Glu Val Ala
 210 215 220
 Leu Thr Asp Arg Leu His Gly Met Ile Phe Ser Tyr Ile Thr Gly Thr
 225 230 235 240
 25 Pro Cys Val Val Leu Ala Asn Asn Asn His Lys Ile Glu Gly Thr Tyr
 245 250 255
 Lys His Trp Leu Asn Glu Val Asn Tyr Ile Arg Phe Ile Glu Asn Pro
 260 265 270
 Thr Val Glu Asn Ile Leu Asp Ala Ile Asn Asp Leu Lys Gln Ile Glu
 275 280 285
 30 Pro His Tyr Ile Asp Leu Ser Asp Lys Phe Gln Pro Leu Ile Asp Ala
 290 295 300
 Ile Lys Gly
 305

- 35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide"
 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GTTGCGGCCG CGATAAAGTG TGATAAGTCC AG

32

- 45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide"
 50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

ATAGCGGCCG CTTAGCTCAT GTTGATGCGG

30

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 31 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,ique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CCTGCGGCCG CGCTTCCTAA TTCTGTAATC G

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 31 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,ique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CTGGCGGCCG CTACTTCACG TTTCTTTGCA T

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 31 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,ique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide"

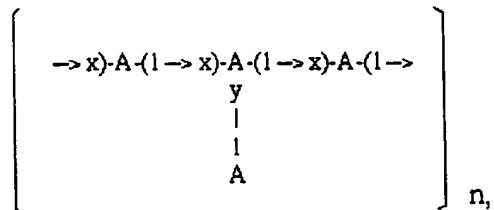
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

TACGCGGCCG CACATAGAAT AAGGCTTTAC G

31

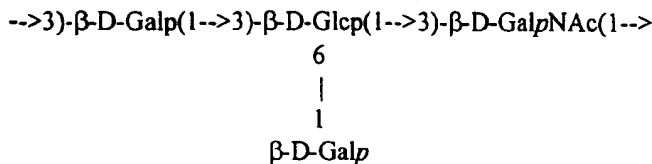
Revendications

1. ADN d'origine chromosomique de bactérie lactique codant pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'EPS présentant la structure répétée

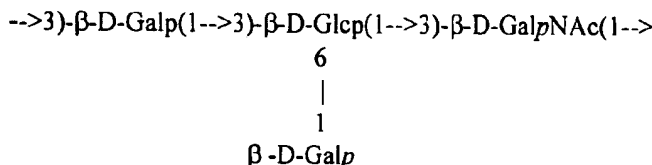


où $n > 1$; A est choisi dans le groupe formé par β -D-Galp, β -D-Glcp et leurs dérivés acétyl et phosphatyl; et x et y = 2, 3, 4, 5 ou 6 sachant que $x \neq y$.

2. ADN selon la revendication 1, codant pour au moins une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'EPS présentant la structure répétée



3. ADN selon la revendication 1, comprenant la séquence nucléique SEQ ID NO:1.
4. ADN selon la revendication 2 comprenant au moins un gène choisi dans le groupe de gènes délimités dans la séquence nucléique SEQ ID NO:1 par les nucléotides 352-1803, 1807-2535, 2547-3239, 3249-3995, 4051-4731, 4898-5854, 6425-7540, 7736-8212, 8221-9192, 9285-10364, 10392-11339, 11302-12222, et 12233-13651.
5. ADN selon la revendication 2, qui est homologue ou qui s'hybride à un ADN selon l'une des revendications 3 et 4.
6. Vecteur recombinant comprenant un ADN selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Protéine susceptible d'être impliquée dans la biosynthèse de l'EPS présentant la structure répétée



et ayant la séquence en acides aminés choisie dans le groupe formé par les séquences SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, et les séquences homologues fonctionnelles.

8. Bactérie lactique comprenant, intégré dans son génome ou par le moyen d'un plasmide répliquable, un fragment d'ADN selon la revendication 1.
9. Procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'un EPS selon la revendication 7, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la répllication autonome ou l'intégration dans une cellule hôte, (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.
10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel le vecteur comprend en outre une séquence promoteur et d'activation traductionnelle fonctionnels dans ladite cellule hôte.
11. Procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour au moins une des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'un EPS, (2) on transforme par ledit vecteur une bactérie lactique produisant le cas échéant un autre EPS, (3) puis on cultive la bactérie lactique transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un nouvel EPS.
12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, dans lequel on clone dans un vecteur un fragment d'ADN selon l'une des revendications 2 à 5.
13. Utilisation d'un fragment d'ADN de la séquence SEQ ID NO:1 ou de son brin complémentaire, d'au moins 15pb, comme amorce utilisable dans une réaction de PCR ou comme sonde pour détecter *in-vitro* ou inactiver *in-vivo* des gènes de bactéries lactiques impliquées dans la biosynthèse d'un EPS.

Figure 1

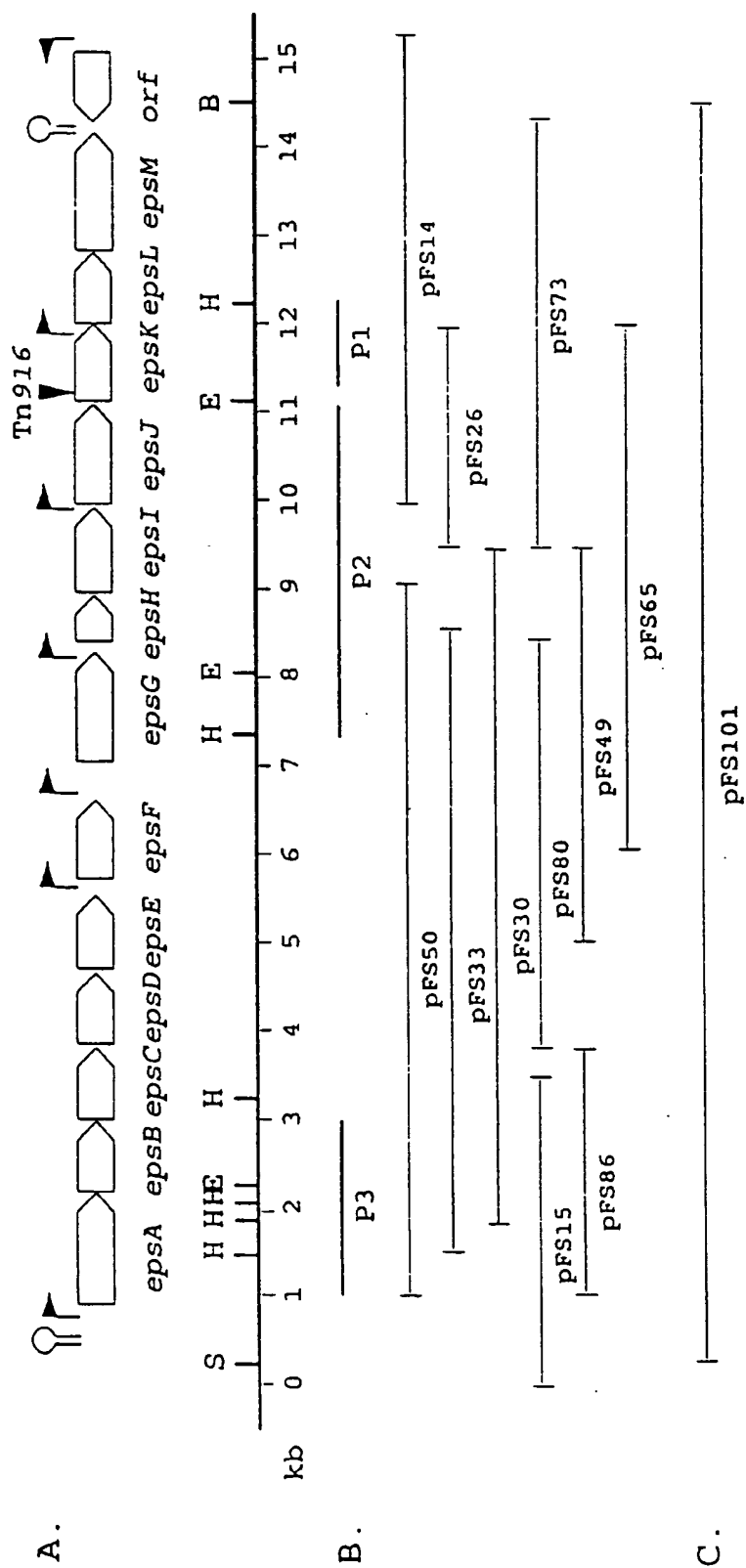
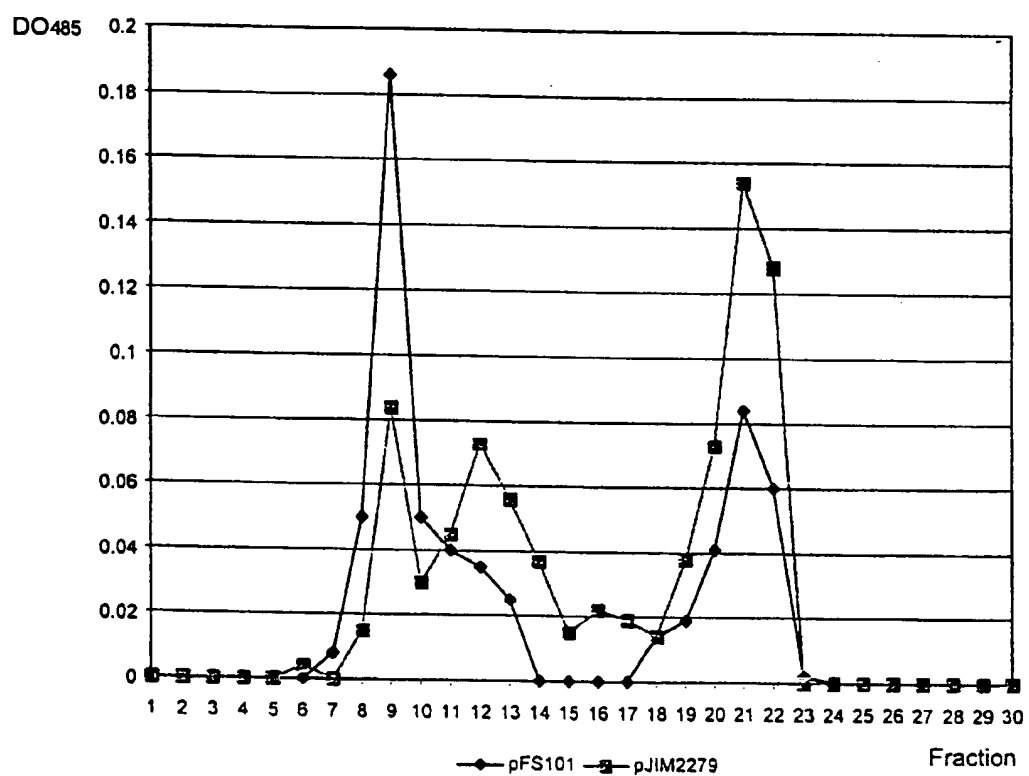


Figure 2





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 95 20 3663

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	DEV. BIOL. STAND. (1995), 85(GENETICS OF STREPTOCOCCI, ENTEROCOCCI AND LACTOCOCCI), 487-493 CODEN: DVBSA3;ISSN: 0301-5149, 1995, XP000603799 STINGELE, F. ET AL: "Homologous integration and transposition to identify genes involved in the production of exopolysaccharides in Streptococcus thermophilus" * page 487, alinéa 1 - page 490, alinéa 2 *	1-13	C12N15/52 C12N15/74 C12N9/00 C12N1/21 C12P19/14 C12Q1/68
A	--- INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 12, WASHINGTON US, pages 5384-5396, XP002015452 ANGELO GUIDOLIN ET AL.: "Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in Streptococcus pneumoniae type 19F" * abrégé; figure 2 * * page 5389, colonne de droite, alinéa 2 - page 5390, colonne de gauche, alinéa 2 * * page 5394, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 1 *	1,3-6,11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) C12N C07K C12P C12Q
A	--- MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 239, no. 1-2, BERLIN DE, pages 188-195, XP002015453 ERNESTO GARCIA ET AL.: "Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae type 3" * abrégé * * page 189, colonne de droite, alinéa 5 - page 191, colonne de gauche, alinéa 1; figure 4 * * page 193, colonne de gauche, alinéa 2 - page 194, colonne de gauche, alinéa 1 *	1,3-7,11	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 9 Octobre 1996	Examineur Montero Lopez, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03.82 (P04C02)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 95 20 3663

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
D,A	BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 11, no. 10, pages 709-712, XP000603812 MARISA VESCOVO ET AL.: "Plasmid-encoded ropiness production in Lactobacillus casei ssp. casei" * abrégé * * page 711, alinéa 2 *	1	
A	WO-A-88 00948 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 11 Février 1988 * page 1, alinéa 3 * * page 3, alinéa 2 - page 6, alinéa 1 * * page 7, alinéa 2 - page 10, alinéa 1 *	1,6,8,9	
D,A	WO-A-92 02142 (SING, WESLEY, D.) 20 Février 1992 * page 8, ligne 1 - ligne 24 *	1,6-10	
D,A	CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 198, no. 2, 1 Mai 1990, AMSTERDAM NL, pages 313-321, XP002015454 THIERRY DOCO ET AL.: "Structure of an exocellular polysaccharide produced by Streptococcus thermophilus" * abrégé * * page 313, alinéa 1 - page 314, alinéa 1 *	1,2,7-10	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Lien de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
LA HAYE		9 Octobre 1996	Montero Lopez, B
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

[My Account](#) | [Products](#)Search: [Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Derwent](#)[Help](#)

The Delphion Integrated View

Get Now:  [PDF](#) | [More choices...](#)Tools: Add to Work File: [Create new Work File](#) View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)[Go to: Derwent](#) [Email this to a friend](#)Title: **EP0750043B1: Exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria**[\[German\]](#)[\[French\]](#)Derwent Title: DNA of lactic acid bacteria - encoding enzymes involved in exopolysaccharide biosynthesis [\[Derwent Record\]](#)

Country: EP European Patent Office (EPO)

Kind: B1 Patent (See also: [EP0750043A1](#))Inventor: Stingele, Francesca;
Mollet, Beat;Assignee: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 2001-05-23 / 1995-12-28

Application Number: EP1995000203663

IPC Code: [C12N 15/52](#); [C12N 15/74](#); [C12N 9/00](#); [C12N 1/21](#); [C12P 19/14](#);
[C12Q 1/68](#);

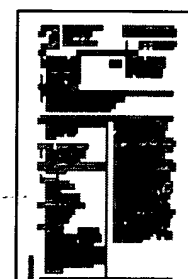
ECLA Code: C12N15/52;

Priority Number: 1995-06-20 [EP1995000201669](#)Abstract: [From equivalent [EP0750043A1](#)] DNA of lactic acid bacteria A chromosomal DNA of a lactic acid bacterium is claimed, where the DNA encodes at least one enzyme involved in the biosynthesis of an exopolysaccharide (EPS) having the repeat structure: [-x)-A-(1-x)-A((y-1)A)-(1-x)-A-(1-n where n > 1; A = α -D-Galp, α -D-Glcp or their acetyl or phosphate derivs.; and x and y = 2-6, provided that x and y are different. Also new is a protein involved in the biosynthesis of an EPS having the repeat structure: -3- α -D-Galp1-3- α -D-Glcp(6-1- α -D-Galp)-1-3- α -D-GalpNac1- and has an amino acid sequence selected from 13 defined sequences given in the specification.

Attorney, Agent or Firm: Van Malderen, Joelle ;

[Show legal status actions](#) Get Now: [Family Legal Status Report](#)

Legal Status: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LT LU LV NL PT SE SI

Designated Country: [Show known family members \(at least 12\)](#)Description: [Expand full description](#) [From equivalent [EP0750043A1](#)]+ [Etat de la technique](#)
+ [Etat de la technique](#)
+ [Résumé de l'invention](#)
+ [Résumé de l'invention](#)[High Resolution](#)[Low Resolution](#)

55 pages

This Page Blank (uspto)


- + Description des figures:
- + Description des figures:
- + Description détaillée de l'invention
- + Description détaillée de l'invention
- + Milieux: (rajouter 1,5% de Bacto-agar pour un milieu solide)
- + Milieux: (rajouter 1,5% de Bacto-agar pour un milieu solide)
- + Exemple I: clonage d'un fragment d'ADN de la souche *S. thermophilus* Sfi6
- + Exemple I: clonage d'un fragment d'ADN de la souche *S. thermophilus* Sfi6
- + I.7. Analyse de la séquence SEQ ID NO:1:
- + I.7. Analyse de la séquence SEQ ID NO:1:
- + Exemple II: inactivation du gène *epsJ*
- + Exemple II: inactivation du gène *epsJ*
- + Exemple III: inactivation des gènes *eps A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M*
- + Exemple III: inactivation des gènes *eps A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M*
- + Exemple IV: restauration de la production d'EPS
- + Exemple IV: restauration de la production d'EPS
- + Exemple V restauration de la production d'EPS
- + Exemple V restauration de la production d'EPS
- + Exemple VI modification d'un EPS
- + Exemple VI modification d'un EPS
- + Exemple VII modification d'un EPS
- + Exemple VII modification d'un EPS
- + Exemple VIII modification d'un EPS
- + Exemple VIII modification d'un EPS
- + LISTE DE SEQUENCES

First Claim:
[Show all claims](#)

1. DNA molecule encoding at least one enzyme involved in the biosynthesis of an exopolysaccharide being produced by a lactic bacterium, which is formed by an assembly of various different sugars forming a repetitive unit having the following structure : characterized in that it consists in a gene selected from the group of genes (1) which are limited within the nucleic sequence SEQ ID NO 1 by nucleotides 352-1803, 1807-2535, 2547-3239, 3249-3995, 4051-4731, 4898-5854, 6425-7540, 7736-8212, 8221-9192, 9285-10364, 10392-11339, 11302-12222 and 12233-13651, sequences which have the same function and an identity rate of more than 70% with the sequences being limited within the nucleotidic sequence SEQ ID NO 1 by nucleotides 352-1803, 1807-2535, 2547-3239, 3249-3995, 4051-4731, 4898-5854, 6425-7540, 7736-8212, 8221-9192, 9285-10364, 10392-11339, 11302-12222 et 12233-13651, and the nucleotidic sequences which have the same function and are hybridised in stringent conditions with the sequences being limited within the nucleotidic sequence SEQ ID NO 1 by nucleotides 352-1803, 1807-2535, 2547-3239, 3249-3995, 4051-4731, 4898-5854, 6425-7540, 7736-8212, 8221-9192, 9285-10364, 10392-11339, 11302-12222 et 12233-13651.
 [German] [French]

Forward
 References:

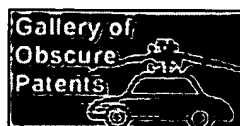
Go to Result Set: Forward references (1)

PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
	US6022568	2000-02-08	Lesens; Corinne	Nestec, S.A.	Ice cream with coating containing lactic acid bacteria

Other Abstract
 Info:

CHEMABS 126(12)155045N DERABS C1997-044836 DERABS C1997-044837

This Page Blank (uspto)



[Nominate this for the Gallery...](#)



© 1997-2004 Thomson

[Research Subscriptions](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

This Page Blank (uspto)